



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Campus de São José do Rio Preto

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

MAURÍCIO PAPA DE ARRUDA

Avaliação da organização da variabilidade genética em populações de
anfíbios de habitats antropizados por meio de marcadores
microssatélites

Tese apresentada para obtenção do Título
de Doutor em Genética.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliana Morielle Versute

São José do Rio Preto – SP

2010

Arruda, Maurício Papa de.

Avaliação da organização da variabilidade genética em populações de anfíbios de habitats antropizados por meio de marcadores microsatélites / Maurício Papa de Arruda. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2010.

119 f. : il. ; 30 cm

Orientadora: Eliana Morielle Versute

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética de populações. 2. Anfíbio - Variabilidade genética. 3. Marcadores microsatélites. 4. Genética da conservação. I. Versute, Eliana Morielle. II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU - 575.17

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
Campus de São José do Rio Preto - UNESP

MAURÍCIO PAPA DE ARRUDA

Avaliação da organização da variabilidade genética em populações de
anfíbios de habitats antropizados por meio de marcadores
microssatélites

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Eliana Morielle Versute

Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Orientadora

Prof. Dr. Fabrício Rodrigues dos Santos

Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) – 1º Examinador

Prof^a. Dr^a. Luciana Bolsoni Lourenço

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) – 2º Examinador

Prof^a. Dr^a. Cláudia Marcia Aparecida Carareto

Universidade Estadual Paulista (UNESP) – 3º Examinador

Prof^a. Dr^a. Lilian Ricco Medeiros

Universidade Estadual Paulista (UNESP) – 4º Examinador

São José do Rio Preto, 26 de fevereiro de 2010.

*Dedico esse trabalho aos meus pais,
Angela e Nozor, minhas irmãs Maricy
e Milena, meus avôs Luiza e Hermes,
Neguinha e Gino e ao meu sobrinho
Gucci pelo amor incondicional.
Amo vocês.*

*Igualmente ofereço a todos os
anfíbios, utilizados ou não nesse
trabalho.*

AGRADECIMENTOS

O estudo desenvolvido não teria o mesmo conteúdo sem pessoas e anfíbios que colaboraram estreitamente em diversas etapas. Assim, considero que todos estão interligados a esse trabalho e, portanto, não carrego a responsabilidade dele sozinho. Logo, agradeço além da minha família e dos anfíbios aos seguintes amigos:

Prof^a. Dr^a. Eliana Morielle Versute, minha orientadora pela ajuda e incentivo à minha inserção ao meio científico e ao Prof. Dr. Evonnildo Costa Gonçalves (UFPA) pela confiança e sugestão de parceria entre nossos laboratórios.

Aos professores do Laboratório de Polimorfismo de DNA (LPDNA), Artur Luiz da Costa da Silva, John McCulloch, Maria Paula Cruz Schneider e Sara Cuadros pela receptividade e amizade.

Aos meus amigos de coleta Vitão, Thiago Fogo, Rineu e Alexandre Chuchu pela companhia e descontração nos momentos de chuvas, raios, lamas, cascavéis, e atoleiros (tanto do carro como de nós).

A todos os (ex-) pesquisadores do Laboratório de Chiroptera (UNESP-IBILCE), Bruno, Fábio, Karina, Mateus e Sandra, pela amizade sincera, com agradecimento especial para minha terceira irmã Paula Renata.

Aos técnicos, Jorge (Laboratório de Chiroptera), Vagner e Silvanira (LPDNA) pelo auxílio importantíssimo prestado.

A Soraya (LPDNA) pelo cuidado e atenção no sequenciamento.

Aos meus amigos e (ex-) companheiros de LPDNA, Adonis, Adriana, Alessandra, Amanda, Baraúna, Cíntia, Cíntia Sayaka, Derik, Diego Di, Emilito, Giovanna, Heitor Pateta, Hivana, Juliana, Kauê, Leonardo Perigoso, Louise, Luís Cláudio, Luís Guimarães, Mariana Pureza, Natália, Paulo Foley, Priscila, Rafael Barata, Raimundo, Ricardo Maníaco, Rogério Seu Moço, Rommel, Samir, Sávio Tracajá, Tibério Paraense e Wanderson, pelas conversas, almoços, intervalos, filmes, jogatinas, baladas e confraternizações agradáveis.

A Larissa Paola Rodrigues Venâncio pelos ensinamentos na construção das bibliotecas, ao Sávio Pinho dos Reis pelo auxílio na genotipagem e a Maria do Socorro Corrêa Pereira pelas instruções e dicas de manuseio do Alf.

E a todos meus amigos fora do meio científico.

Muito obrigado.

“O ser humano é parte de um todo, conhecido como Universo. Por ser parte, ele é limitado no tempo e no espaço. Suas sensações e seus pensamentos são percebidos como separados do resto – um tipo de ilusão de ótica de sua consciência. Essa ilusão é como uma prisão para nós, nos restringindo aos nossos desejos imediatos e ao amor por aqueles mais próximos. Nosso objetivo deve ser nos libertarmos dessa prisão, aumentando os nossos círculos de compaixão até englobar todos os seres vivos e a Natureza em toda sua beleza”.

Albert Einstein

RESUMO

A destruição e a modificação do hábitat são aceitas, entre os biólogos conservacionistas, como as causas primárias da perda da biodiversidade, e a situação para os anfíbios não é exceção. Diversos processos antropogênicos contribuem para a deterioração das paisagens, podendo afetar negativamente as populações de anfíbios, por alterar fisicamente os ambientes aquáticos e terrestres, reduzindo a conectividade dos habitats e estruturando as populações. Contudo, poucos dados existem sobre os efeitos do cultivo agrícola para as populações de anfíbios. Os programas de preservação atuam na recuperação de populações ameaçadas e, em geral, estão baseados na manutenção da máxima quantidade de diversidade genética, de tal forma que, a primeira etapa de um programa conservacionista, consiste na avaliação da variabilidade genética e distribuição desta entre as populações. A estruturação gênica populacional dos organismos, estimada a partir de técnicas de biologia molecular é um aspecto fundamental na caracterização da aptidão das espécies aos ambientes. Particularmente os marcadores moleculares do tipo microssatélite tem acessado com êxito a variabilidade gênica das populações.

Assim, foram desenvolvidos *loci* microssatélites polimórficos para as espécies *Hypsiboas raniceps*, *Leptodactylus chaquensis* e *Rhinella schneideri* e avaliada a variabilidade genética de populações provenientes de habitats com diferentes tipos de perturbação antrópica (práticas agrícolas, pastagem), com o intuito de relacionar o impacto de diferentes matrizes sobre a diversidade genética. A espécie generalista *R. schneideri* exibiu um estoque uniforme de variabilidade genética, baixa estruturação e reduzido nível de endogamia em todas as populações, sugerindo um elevado potencial de dispersão, responsável pela homogeneização das populações. Contudo, em *L. chaquensis* e *H. raniceps*, as populações localizadas em região com forte impacto agrícola (Tietê Batalha) exibiram empobrecimento genético e forte estruturação populacional. É possível concluir que as práticas agrícolas têm efeito direto na redução da diversidade genética em anfíbios, quando essas culturas fornecem barreiras geográficas para a dispersão (redução da dispersão mais provável em espécies com baixa vagilidade) e, dessa forma, promovendo uma fragmentação do hábitat a nível espécie-específico. As principais implicações conservacionistas incluem a redução do cultivo de práticas agrícolas densas e

intensivas (e.g. cana-de-açúcar) na região do Tietê Batalha, e o monitoramento (ecológico e genético) das populações de *H. raniceps* e *L. chaquensis* nessa região.

Palavras-chave: microsatélites; genética da conservação; diversidade genética; Amphibia; estrutura populacional

ABSTRACT

The destruction and modification of habitat are accepted between conservation biologists as the primary causes of biodiversity loss, and the situation for amphibians is no exception. Several anthropogenic processes contribute to the deterioration in the landscape, which can adversely affect amphibian populations by physically altering the aquatic and terrestrial environments, reducing the connectivity of habitats and structuring populations. However, few data exist on the effects of the crop for the populations of amphibians. The conservation programs act in the recovery of threatened populations, and generally are based on maintaining the maximum amount of genetic diversity, therefore, the first step in a conservationist program, is to assess the genetic variability and distribution of this among the populations. Population structure of organisms, estimated from molecular biology techniques is fundamental to characterize the fitness of species to environments. Particularly the molecular markers microsatellite has successfully accessed the genetic variability of populations.

Therefore, we developed polymorphic microsatellite loci in the *Hypsiboas raniceps*, *Leptodactylus chaquensis* and *Rhinella schneideri* species and evaluated the genetic variability of populations from habitats with different types of anthropogenic disturbance (agricultural practices, pasture), in order to relate the impact of different matrix on genetic diversity. *R. schneideri* generalist species showed an even amount of genetic variability, low structure and low level of inbreeding in all populations, suggesting a high potential for dispersal, responsible for the homogenization of populations. However, in *L. chaquensis* and *H. raniceps*, the populations located in regions with strong agricultural impact (Tietê Batalha) showed genetically depauperate and strong population structure. It can be concluded that agricultural practices have a direct effect on the reduction of genetic diversity in amphibians, when these cultures provide geographical barriers to dispersion (dispersion reduction more likely in species with low vagility), and thus promoting the fragmentation of habitat at the species-specific level. The main conservation implications include reducing the cultivation of intensive and dense agricultural practices (e.g. sugarcane) in the Tietê Batalha region, and monitoring (ecological and genetic) of *H. raniceps* and *L. chaquensis* populations this region.

Key words: microsatellite; conservation genetics; genetic diversity; Amphibia; population structure

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
1.1 OBJETIVOS.....	19
2 CAPÍTULO I: ANÁLISE DA ORGANIZAÇÃO GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE ANFÍBIOS.....	20
2.1 ARTIGO 1: AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DO SAPO GENERALISTA <i>RHINELLA SCHNEIDERI</i> EM HÁBITATS COM PERTURBAÇÃO AGRÍCOLA.....	21
2.2 ARTIGO 2: EMPOBRECIMENTO GENÉTICO DE POPULAÇÕES DE ANFÍBIOS EM AMBIENTES FORTEMENTE PERTURBADOS POR CULTURAS AGROPECUÁRIAS.....	36
3 CAPÍTULO II: MÉTODO PARA ANÁLISE DE FRAGMENTOS.....	63
3.1 ARTIGO 3: AN ALTERNATIVE GENOTYPING METHOD USING DYE-LABELED UNIVERSAL PRIMER TO REDUCE UNSPECIFIC AMPLIFICATIONS.....	64
4 CAPÍTULO III: DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES EM ANFÍBIOS.....	70
4.1 ARTIGO 4: PERMANENT GENETIC RESOURCES ADDED TO MOLECULAR ECOLOGY RESOURCES DATABASE 1 MAY 2009–31 JULY 2009.....	71
4.1.1 ARTIGO 4: MANUSCRITO ORIGINAL.....	76
4.2 ARTIGO 5: DEVELOPMENT OF ELEVEN POLYMORPHIC MICROSATELLITE MARKERS FOR THE CHACO TREEFROG, <i>HYPISIBOAS RANICEPS</i>	85
4.3 ARTIGO 6: TWELVE POLYMORPHIC MICROSATELLITE LOCI DEVELOPED AND OPTIMIZED FROM THE <i>LEPTODACTYLUS CHAQUENSIS</i>	89
5 DISCUSSÃO GERAL.....	96
5.1 DESENVOLVIMENTO DOS MICROSSATÉLITES.....	96
5.2 ANÁLISES POPULACIONAIS.....	99
CONCLUSÕES.....	102
REFERÊNCIAS.....	104
APÊNDICE 1.....	113

1 INTRODUÇÃO

A classe Amphibia vem sofrendo um grande declínio global nas décadas recentes, tornando-se mais ameaçada que aves e mamíferos, devido a um conjunto de fatores que afetam suas comunidades naturais (STUART et al., 2004), como destruição e fragmentação dos habitats; mudança climática que afeta especialmente os animais ectotérmicos terrestres (ALEXANDER; EISHEID, 2001); redução da camada de ozônio, que tem gerado um aumento da radiação ultravioleta (UV), afetando a formação dos girinos e ocasionando uma diminuição no valor adaptativo das espécies; poluição das águas, além da introdução de predadores (ALFORD; RICHARDS, 1999; MARSH, 2001).

O incremento das atividades humanas tem contribuído para a perda de uma parcela importante da biodiversidade global. O desenvolvimento e a implementação de estratégias que atenuem esse processo representam os maiores desafios científicos atuais (EWERS, 2005). De fato, em diversos biomas brasileiros, notadamente a Mata Atlântica e o Cerrado, o processo de ocupação humana fez com que fragmentos pequenos e isolados sejam os únicos representantes atuais da antes abundante cobertura vegetal natural. Quanto mais elevado o impacto antrópico nas paisagens naturais, maiores são os esforços para a conservação da variabilidade genética das espécies (FICETOLA; BERNARDI, 2004).

A vegetação natural da região Noroeste Paulista é caracterizada pela presença de florestas estacionais semidecíduas e savana, e esta formação restringe-se hoje a 9% de sua área original, tendo sido substituída por pastagens, culturas diversas ou áreas urbanas. Tal impacto coloca a região como a mais desmatada e fragmentada do estado de São Paulo e com a menor concentração de unidades de conservação, compondo um quadro que aparentemente não será remodelado sem ações de manejo do meio ambiente (KRONKA et al., 1993).

Aliando teorias genéticas às técnicas moleculares, a genética da conservação tem o intuito de reduzir o risco de extinção das espécies, disponibilizando ferramentas de análise que permitam direcionar de forma mais eficiente estratégias de gerência e proteção das espécies (FRANKHAM et al., 2003). As principais aplicações dessa ciência tem sido verificar o sucesso de programas de translocação ou de corredores ecológicos; selecionar e priorizar espécies para programas de proteção, direcionando o manejo; e orientar, em casos extremos, programas induzidos de mistura gênica. Os dados básicos para esses estudos são os

chamados marcadores moleculares, que representam *loci* gênicos ou regiões genômicas que apresentam alguma variabilidade no escopo do problema a ser estudado (PEREZ-SWEENEY et al., 2004).

Os marcadores moleculares baseados em DNA permitem ampla cobertura genômica, e tornam-se assim, ferramentas para o acesso à variabilidade genética das populações. Entre as técnicas para a detecção de marcadores moleculares que utilizam o princípio da PCR – Reação em cadeia da polimerase – podem ser destacadas as técnicas de RFLP, RAPD e microssatélite. Potencialmente, todas as espécies podem ser estudadas com estas técnicas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Os microssatélites ou SSRs (*simple sequence repeats*) são sequências de DNA compostas por motivos de 1 a 6 nucleotídeos repetidos em *tandem*, extensamente dispersos e abundantes no genoma de diversos organismos, principalmente eucariotos (GOLDSTEIN; POLLOCK, 1997; CHISTIakov et al., 2006). Essas regiões apresentam *loci* multialélicos de natureza altamente polimórfica, típica neutralidade, relativamente pequenos (20 a algumas centenas de bases), com herança mendeliana e caráter co-dominante, o que permite a identificação de ambos os alelos em qualquer população segregante (SCHLÖTTERER, 2004) e, portanto, de grande conteúdo informativo para estudos em diversidade genética (WEBER, 1990).

Atribuído dessas particularidades apreciáveis, o DNA microssatélite é eficiente na detecção de diferenças genéticas sutis (CHAMBERS; MACAVOY, 2000; ZANE et al., 2002), e foi convertido em uma classe de marcador molecular versátil e altamente reprodutível, que pode ser analisado a partir de pequenas quantidades de DNA por amplificação via PCR dos fragmentos que contém as repetições, utilizando-se como iniciadores, oligonucleotídeos que hibridizam com as regiões que flanqueiam as repetições. O tamanho dos alelos pode ser estimado em sequenciadores semi- ou automatizados de DNA com corantes fluorescentes, autoradiografia, espectrometria de massa, géis de poliacrilamida impregnados por prata ou agarose de alta resolução corados com brometo de etídio. Os *loci* podem ser determinados individualmente ou em reações *multiplex*, características estas altamente desejáveis em um marcador molecular (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Os microssatélites estão inseridos preferencialmente em regiões não codificantes, o que proporciona uma alta variabilidade de alelos. As diferenças dos alelos (polimorfismos observados) são devidas aos números distintos de repetições, oriundos de conversão gênica ou ao pareamento incorreto com subsequente deslizamento “*slippage*” da enzima DNA polimerase durante a replicação ou reparo da molécula de DNA (CHISTIAKOV et al., 2006).

O processo inicial para o estudo dos microssatélites envolve o conhecimento prévio das sequências únicas que delimitam a região contendo as repetições em *tandem*, para que seja possível a confecção dos iniciadores. Os microssatélites devem ser isolados preferencialmente para cada espécie, uma vez que a presença típica dos microssatélites em regiões não codificantes, onde a taxa de substituição nucleotídica é maior, dificulta a estratégia de projetar iniciadores universais com sequências conservadas. Contudo, existe a possibilidade de amplificação (transferibilidade) de iniciadores heterólogos, que desenvolvidos em uma espécie podem ser aplicados em outros táxons do mesmo gênero (CIPRIANI et al., 1999). Essa possibilidade é atribuída à homologia dos sítios flanqueadores dessas regiões em espécies próximas filogeneticamente (HOPKINS et al., 1999). O índice de transferibilidade declina conforme a distância filogenética entre os táxons aumenta (ROA et al., 2000), e em genomas extensos como no caso de anfíbios (GARNER, 2002; PRIMMER; MERILLÄ, 2002).

Quando o organismo alvo não apresenta informações acerca do genoma ou de espécies próximas, o acesso às regiões microssatélites para o desenvolvimento de iniciadores específicos requer procedimentos laboriosos e custosos, como a construção de bibliotecas genômicas (BROWN et al., 1996). Entretanto, pode ser a melhor opção para o estudo de um novo *locus* ou táxon (MAGUIRE, 2001). Além disso, uma vez isolados, eles fornecem muitas potencialidades de pesquisa e tecnologia e podem ser utilizados com facilidade, eficiência e rapidez típica da técnica de PCR.

Os procedimentos que empregam algum método de enriquecimento por hibridização seletiva têm fornecido uma maior eficiência no isolamento das regiões microssatélites. O protocolo comum desse método foi originalmente proposto por Karagyozov et al. (1993); Armour et al. (1994) e Kijas et al. (1994) e consiste na fragmentação do DNA em pequenos fragmentos para serem ligados a adaptadores específicos. Após esta etapa, o DNA é amplificado via PCR e hibridizado com

sondas constituídas de repetições desejadas, podendo a sonda estar imobilizada em uma membrana de nylon (KARAGYOZOY et al., 1993; ARMOUR et al., 1994) ou biotiniladas e aderidas a contas magnéticas revestidas por estreptavidina (KIJAS et al., 1994). Assim, o DNA hibridizado pode ser seletivamente recuperado. Em seguida, o DNA enriquecido é clonado em um vetor adequado e os clones detectados por sequenciamento, varredura por *Southern blot* ou por PCR.

Pelo elevado conteúdo polimórfico informativo e distribuição quase randômica, os microssatélites são atrativos e empregados em um expressivo número de aplicações biológicas como: construção de mapas genéticos por desequilíbrio de ligação, em que associações entre os marcadores e QTLs (*locus* de caracteres quantitativos) de interesse econômico e medicinal são procurados em populações (WALTER et al., 2004; LEE et al., 2005); no diagnóstico de doenças (O'DONNELL; WARREN, 2002); em práticas forenses, para identificação de indivíduos e teste de paternidade (OLAISEN et al., 1997); em estudos de animais e plantas de interesse econômico, para análises de parentesco, sexagem e *pedigree* (DREISIGACKER et al., 2004) e em genética populacional (KRAAIJEVELD-SMIT et al., 2005).

Pesquisas em genética da conservação focalizam no uso de marcadores moleculares neutros. Estas aplicações são usadas principalmente para unidades de manejo (MUs) e a origem de indivíduos (MORITZ, 1999). Os microssatélites com modelo de variação tipicamente neutra têm alto conteúdo informativo na investigação de processos não-seletivos em paisagens (ANTOLIN et al., 2006; HOLDEREGGER et al., 2006), como tamanho populacional (KUHNER et al., 1998; SCHWARTZ et al., 1998), evento de gargalo de garrafa (LUIKART; CORNETT, 1998), fluxo gênico (LATTA; MITTON, 1997), efeito fundador (CARVAJAL-CARMONA et al., 2000), além de traçar relacionamentos (CORNUET et al., 1999) ou níveis de endocruzamento (ELLEGREN, 1999; LYNCH; RITLAND, 1999).

Embora não possa ser associado diretamente ao potencial evolutivo, os dados genéticos neutros estimados por microssatélites em nível individual (heterozigosidade H), são vinculados com a aptidão individual (DA SILVA et al., 2006). Isso pode ser elucidado pelo fato dos níveis de diversidade genética neutra relacionarem-se com o coeficiente de endocruzamento (REED; FRANKHAM, 2003), assim é esperado que uma redução na diversidade gênica reflita endogamia, e esta tende a diminuir a aptidão reprodutiva. Desse modo, os níveis de heterozigosidade

determinados por SSRs permitem inferir êxito reprodutivo, recrutamento (HOFFMAN et al., 2004; SEDDON et al., 2004) e taxa de sobrevivência (MARKERT et al., 2004; DA SILVA et al., 2006). Adicionalmente os níveis da heterozigosidade correlacionam-se positivamente com o tamanho populacional (FRANKHAM, 1996), portanto existe uma expectativa que essa heterozigosidade também corresponda ao tamanho populacional.

Em anfíbios, a maioria dos trabalhos com marcadores microsatélite tem por objetivo o acesso à estrutura populacional (SHAFFER et al., 2000; TALLMON et al., 2000; ZEISSET; BEEBEE, 2003; BURNS et al., 2004; LESBARRÈRES et al., 2005). De forma geral, as populações de anfíbios são distribuídas em metapopulações, onde o espaço é finito, sendo isto usado para distinção entre os demes (populações locais) de uma metapopulação. Quando as populações de uma espécie são muito fragmentadas, pode ser observado um cenário de extinções locais e recolonizações, havendo um grande fluxo de indivíduos entre os demes (HANSKI; GILPIN, 1997). Smith e Green (2005) sugerem cautela na aplicação de padrões de locomoção nos anfíbios, pois existe uma larga escala de habilidade de dispersão dentro das espécies do grupo, e esses cuidados devem ser tomados especialmente onde as decisões de conservação devem ser baseadas nas suposições de isolamento e dispersão das populações.

A redução das populações de anfíbios, de uma maneira geral, tem sido utilizada como bioindicador de ambientes alterados, por serem animais muito sensíveis às mudanças no seu hábitat natural (GRAY et al., 2004). Além disso, os anfíbios são excelentes modelos para a investigação genética de populações selvagens, pois são distribuídos extensamente na maioria dos ecossistemas, frequentemente filopátricos aos sítios de reprodução, gerando níveis elevados de estruturação genética populacional e, apesar do grande interesse focado na conservação, esta área de pesquisa está sub-representada (SCRIBNER et al., 2001; BEEBEE, 2005). Desta forma, as espécies de anfíbios representam organismos-modelo para testar os efeitos da fragmentação da paisagem e da perda de habitats (PALO et al., 2004).

A estruturação genética de populações refere-se a distribuição da variabilidade genética, destas populações, no espaço e no tempo. Em populações fragmentadas, quanto maior a estruturação, maiores as diferenças genéticas das populações. A variação genética pode estar associada a diversos fatores como

processos estocásticos de coalescência (vicariância), mutação, migração (fluxo gênico), deriva genética ou a pressões seletivas em função de diferentes condições ambientais (AVISE, 2000), que por sua vez devem operar num contexto biológico e histórico de cada espécie (LOVELESS; HAMRICK, 1984).

Com base nessas premissas, podemos inferir que o exame dos processos evolutivos atuantes na diferenciação das populações locais estruturadas exige a análise simultânea de traços genéticos e fenotípicos nessas populações, além da caracterização ambiental associada à distância geográfica entre elas (EPPERSON 2003; ROUSSET, 2004). Deste modo, o conhecimento da estrutura genética das populações naturais, especialmente quando estabelecido a partir de dados moleculares, é de suma importância para direcionar programas de manejo e proteção das populações (CROZIER, 1997).

A destruição e fragmentação do hábitat são aceitas, entre os biólogos conservacionistas, como sendo as causas primárias da perda da biodiversidade, e a situação para os anfíbios não é exceção. Diversos processos antropogênicos contribuem para a deterioração das paisagens, podendo afetar negativamente as populações de anfíbios, por alterar fisicamente os ambientes aquáticos e terrestres, reduzindo a conectividade dos habitats e estruturando as populações. Contudo, poucos dados existem sobre os efeitos do cultivo agrícola para as populações de anfíbios. Os programas de conservação de animais vivos "*in situ*" prognosticam a importância da manutenção da máxima quantidade de diversidade genética com o mínimo incremento possível de consanguinidade por geração, almejando minimizar o risco de extinção das espécies (FRANKHAM, 1995; HAIG; AVISE, 1996). Assim, uma das medidas primordiais para um programa conservacionista de sucesso consiste na avaliação da variabilidade genética e a distribuição desta entre as populações (GONZÁLEZ-CANDELAS; MONTOLIO, 2000).

A diversidade genética é cada vez mais avaliada por métodos moleculares, em que se examinam diferenças na constituição do DNA, RNA ou de determinadas proteínas entre os organismos ou populações. Este estudo é essencial para a conservação biológica, pois a perda de diversidade genética de uma espécie aumenta muito o risco de que ela venha se extinguir (YEEH et al., 1996). A diversidade genética das espécies é crucial para manter a capacidade natural de respostas às mudanças climáticas e a todos os tipos de estresses bióticos e abióticos.

Diversos estudos sobre anfíbios empregam marcadores moleculares para análises populacionais, com enfoques ecológicos, comportamentais e conservacionistas e, que por vezes verificam o impacto das atividades humanas sobre a diversidade genética desses organismos. Noël *et al.* (2007), empregando marcadores microssatélites em populações urbanas, e rurais, da salamandra *Plethodon cinereus*, verificou uma diversidade significativamente menor nas populações urbanas, com uma evidente estruturação entre essas populações, mesmo quando separadas por distâncias pequenas (0.9 a 3.3 km). Arruda e Morielle-Versute (2008), empregando marcadores RAPD, estudaram a composição genética de populações urbanas e rurais de quatro espécies de leptodactídeos e detectaram estruturação genética expressiva em duas espécies (*Leptodactylus labyrinthicus* e *L. ocellatus*); os resultados obtidos foram atribuídos ao elevado processo antropogênico que prejudica a dispersão dos anfíbios.

Com base nesses estudos e considerações, o presente estudo objetivou o acesso e caracterização da variabilidade genética de populações de anfíbios anuros provenientes de habitats com diferentes tipos de perturbações antropogênicas (culturas agrícolas, pastagem), pela análise de *loci* microssatélites que como marcadores hipervariáveis são sensíveis na detecção de eventos recentes de interrupção do fluxo gênico ocasionados por fragmentações antrópicas (MECH; HALLET, 2001; JEHLE; ARNTZEN, 2002).

Foram selecionados para o estudo três espécies de anfíbios pertencentes a três famílias: o sapo *Rhinella schneideri* (Bufonidae), a perereca arborícola *Hypsiboas raniceps* (Hylidae) e a rã *Leptodactylus chaquensis* (Leptodactylidae). Essas espécies predominantemente de formações abertas são amplamente difundidas na América do Sul e associadas a diferentes biomas (DUELLMAN, 1999; BASTOS *et al.*, 2003; LA MARCA *et al.*, 2004), que vêm sendo convertidos por atividades humanas (HADDAD; ABE, 1999), ocasionando perdas populacionais (HEYER *et al.*, 2004; LA MARCA *et al.*, 2004). Espécies que são localmente abundantes, extensamente distribuídas podem servir como organismos informativos para avaliar processos de fragmentação da paisagem e da perda de habitats (COLLI *et al.*, 2002; WHITELEY *et al.*, 2006).

A hipótese do estudo foi que os incrementos nas práticas agrícolas reduzem os níveis de variabilidade genética neutra nas populações. Os resultados forneceram informações acerca do papel das práticas agrícolas sobre a diversidade genética em

anfíbios. Examinar a diversidade genética em espécies pertencentes a estes ecossistemas é o primeiro passo para adoção de medidas de conservação e uso sustentado do ambiente, com intuito de garantir a manutenção da diversidade genética das espécies inseridas no ecossistema local.

1.1 OBJETIVOS

OBJETIVOS GERAIS:

Esse estudo teve como objetivo o desenvolvimento de sequências microssatélites em três espécies de anfíbios (*R. schneideri*, *L. chaquensis* e *H. raniceps*), visando a estimativa da variabilidade genética em populações dessas espécies provenientes de habitats em condições diferentes de preservação (tipo de matriz antrópica). A partir das análises dos marcadores, foi feita a comparação da diversidade genética entre as populações e esta correlacionada à qualidade dos habitats, a fim de possibilitar o entendimento sobre o papel das culturas agrícolas no declínio das populações de anfíbios. Foi também objetivo desse estudo a elaboração de medidas direcionais para um aporte a programas de conservação, baseado nos dados obtidos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1) Desenvolver marcadores microssatélites para três espécies de anfíbios;
- 2) Determinar os genótipos para *loci* microssatélites das populações;
- 3) Estimar estatisticamente a diversidade genética, organização genética e processos demográficos;
- 4) Correlacionar os dados obtidos com o tipo de pressão antropogênica predominante (pastagem, práticas agrícolas);
- 5) Selecionar e priorizar populações e espécies potencialmente importantes a serem conservadas, propondo exequíveis implicações conservacionistas.

2 CAPÍTULO I: ANÁLISE DA ORGANIZAÇÃO GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE ANFÍBIOS

Artigo 1: ARRUDA, M. P. et al. Assessment of genetic diversity of generalist frog *Rhinella schneideri* in habitats with agricultural and livestock grazing disturbance. **Biodiversity and Conservation**, 2010 (A SER SUBMETIDO).

Artigo 2: ARRUDA, M. P. et al. Genetic depletion of amphibians populations in landscape highly disturbed by agricultural crops. **Molecular Ecology**, 2010 (A SER SUBMETIDO).

2.1 ARTIGO 1

*Avaliação da diversidade genética do sapo generalista *Rhinella schneideri* em habitats com perturbações agropecuárias*

Maurício P. ARRUDA¹, Eliana MORIELLE-VERSUTE¹, Artur SILVA², Maria Paula Cruz SCHNEIDER², and Evonnildo C. GONÇALVES²

¹Laboratório de Chiroptera, Departamento de Zoologia e Botânica, UNESP - Universidade Estadual Paulista – Campus de São José do Rio Preto.

²Laboratório de Polimorfismo de DNA, Instituto de Ciências Biológicas, UFPA - Universidade Federal do Pará.

Resumo

O incremento das atividades humanas tem contribuído para a perda de uma parcela importante da biodiversidade global. Em diversos biomas brasileiros, notadamente a Mata Atlântica e o Cerrado (savana), o processo de ocupação humana fez com que fragmentos pequenos e isolados sejam os únicos representantes atuais da antes abundante cobertura vegetal natural. Contudo, os dados sobre os efeitos das práticas agropecuárias para os anfíbios são praticamente desconhecidos. Nós avaliamos a diversidade genética por marcadores microsatélites em populações da espécie generalista *Rhinella schneideri*, pertencentes a ecossistemas fragmentados na região noroeste do estado de São Paulo, Brasil, contendo paisagens antrópicas (agrícolas e áreas abertas de pastagem), com o intuito de relacionar o impacto de diferentes matrizes sobre a variabilidade genética. As populações exibiram um estoque de variabilidade genética uniforme e reduzido nível de endogamia e organização estrutural (F_{st} , R_{st} , N_m , Structure), mesmo em habitats sob forte pressão antropogênica, sugerindo um elevado potencial de dispersão, responsável pela homogeneização das populações.

Introdução

A destruição e a modificação do habitat são aceitas, entre os biólogos conservacionistas, como sendo as causas primárias da perda da biodiversidade em

todo o mundo (Sala et al. 2000), e a situação para os anfíbios não é exceção (Alford e Richards 1999; Cushman 2006). O incremento das atividades humanas tem contribuído para a perda de uma parcela importante dessa biodiversidade, e o desenvolvimento e a implementação de estratégias que evitem ou atenuem esse processo representa um dos maiores desafios científicos atuais (Ewers 2005). De fato, em diversos biomas brasileiros, notadamente a Mata Atlântica e o Cerrado (savana), o processo de ocupação humana fez com que fragmentos pequenos e isolados sejam os únicos representantes atuais da antes abundante cobertura vegetal natural.

A vegetação natural da região Noroeste do estado de São Paulo, Brasil, é caracterizada pela presença de florestas estacionais semidecíduas e savana, e esta formação restringe-se hoje a 9% de sua área original, tendo sido substituída por pastagens, culturas diversas ou áreas urbanas. Tal impacto coloca a região como a mais desmatada e fragmentada do estado de São Paulo e com a menor concentração de unidades de conservação, compondo um quadro que aparentemente não será remodelado sem ações de manejo do meio ambiente (Kronka et al. 1993). Quanto mais elevado o impacto antrópico nas paisagens naturais, maiores são os esforços para a conservação da variabilidade genética natural das espécies (Ficetola e Bernardi 2004).

Os dados sobre os efeitos do cultivo agrícola para os anfíbios são praticamente desconhecidos (Urbina-Cardona et al. 2006), e os resultados contraditórios (Gray et al. 2004). Knutson et al. (1999) examinando a abundância e a diversidade de espécies de sapos e rãs, indicam associações positivas e negativas com a presença de áreas agrícolas. Segundo os autores, alguns fragmentos remanescentes nas paisagens agrícolas podem servir de refúgio para determinadas espécies de anuros. Entretanto, apesar da abundância de algumas espécies em zonas perturbadas, muitas assembléias de anfíbios nesses locais têm uma maior probabilidade de extinção local ou metapopulacional em oposição àquelas presentes em paisagens prístinas (Gray et al. 2004). As espécies variam em sua tolerância à fragmentação ambiental e, as características que contribuem para a sensibilidade a este processo incluem baixa abundância, exigência de grande área, alta flutuação populacional, baixa fecundidade, baixa capacidade de dispersão e requisitos de habitat especiais (Henle et al. 2004).

As informações acerca dos efeitos das práticas agropecuárias para os anfíbios são vitais para compreender a estrutura das comunidades e traçar estratégias de conservação para manutenção de populações e espécies que habitam as paisagens fragmentadas. De acordo com Gardner et al. (2007), a maioria dos estudos sobre os efeitos das mudanças estruturais no hábitat para os anfíbios está confinada a América do Norte, reforçando a importância de estudos em países tropicais e subtropicais que experimentam uma taxa maior de perda de habitats.

O sapo Cururu, *Rhinella schneideri* é a espécie de anfíbio mais comum na América do Sul, com ampla distribuição no Brasil, passando pelo Paraguai até a Bolívia central; e no sudoeste do continente, do centro ao norte da Argentina e Uruguai (Bastos et al. 2003). Contudo, a sua ecologia é pobremente conhecida (Guix 1993), sendo considerada uma espécie de formações abertas e hábitat generalista (Silvano e Pimenta 2003). Espécies que são localmente abundantes e extensamente distribuídas podem servir como organismos-modelo para avaliar processos de fragmentação da paisagem e da perda de habitats (Colli et al. 2002; Whiteley et al. 2006).

Vários estudos têm comprovado a redução da diversidade genética em populações pequenas e isoladas (e.g. Frankham 1996; Young et al. 2000; Johansson et al. 2005). Essa situação induzida pelo homem poderá conduzir a uma redução do tamanho efetivo populacional (Young et al. 1996) e assim, a variabilidade genética será reduzida devido ao aumento da influência da deriva genética e endogamia. Em alguns estudos, os marcadores neutros têm sido utilizados como indicadores de aptidão individual que podem ser empregados na detecção de populações ameaçadas (Reed e Frankham 2003).

O presente estudo objetivou a avaliação da diversidade genética por meio de marcadores microsatélites neutros em populações de *R. schneideri* pertencentes a ecossistemas fragmentados na região noroeste do estado de São Paulo, Brasil, com o intuito de relacionar o impacto de diferentes matrizes antropogênicas (cultivos agrícolas vs áreas abertas de pastagem) sobre a variabilidade genética da espécie *R. schneideri*. Identificar as variáveis que afetam a presença dos anfíbios em determinado hábitat é imperativo para a criação de ferramentas mais robustas para nortear programas de conservação.

Material e métodos

Áreas e coletas

Foram avaliadas seis áreas pertencentes à região Noroeste do estado de São Paulo, Brazil (Figura 1) que estão sob influência de bacias hidrográficas, que variam quanto ao tipo de impacto antrópico predominante: bacia do Baixo Tietê (quatro populações examinadas: Votuporanga, Macaúbal, S. A. Aracanguá e Planalto) caracterizada pela presença de pecuária extensiva (áreas abertas) e bacia do Tietê Batalha (duas populações: Sales e Novo Horizonte) onde predomina áreas de cultivo de cana-de-açúcar (monocultura densa). As áreas são constituídas por açudes, lagoas e brejos em locais de transição entre savana e floresta Atlântica tropical (Tabela 1).

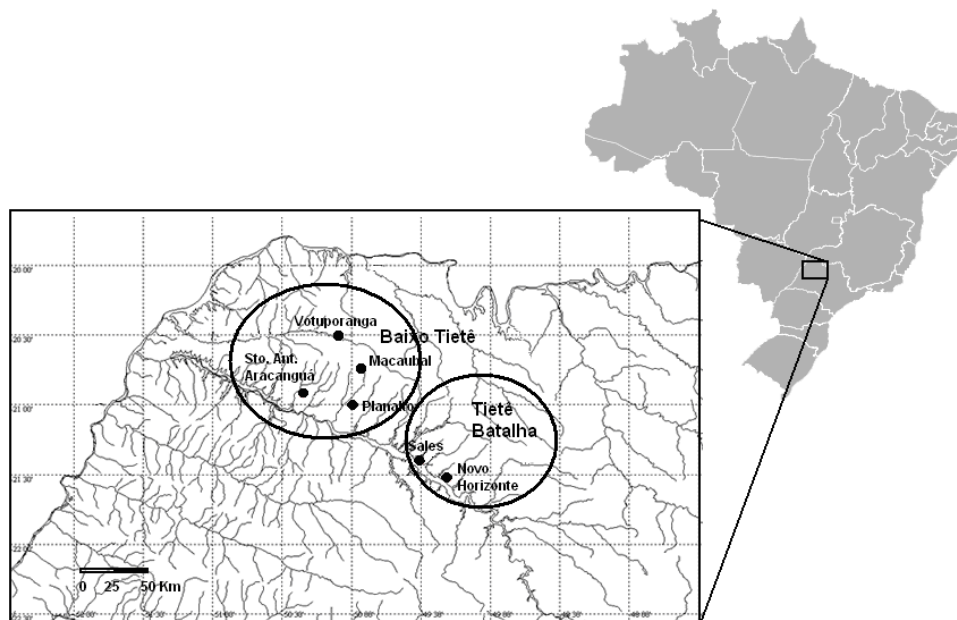


Figura 1: Pontos amostrados da região Noroeste do Estado de São Paulo, Brasil.

Tabela 1: Localização e caracterização da paisagem ambiental das populações amostradas.

Município	Bacia Hidrográfica	Latitude	Longitude	Matriz predominante
Votuporanga	BT	20°30'17.36"S	50°05'42.67"O	Pasto
Macaúbal	BT	20°44'44.34"S	49°56'17.64"O	Pasto
S. A. Aracanguá	BT	20°55'47.25"S	50°21'16.34"O	Pasto
Planalto	BT	20°59'31.28"S	49°58'48.59"O	Pasto
Sales	TB	21°24'39.73"S	49°28'32.64"O	Cana-de-açúcar
Novo Horizonte	TB	21°30'08.16"S	49°18'32.35"O	Cana-de-açúcar

BT = Baixo Tietê; TB = Tietê Batalha

As coletas foram realizadas entre os meses de setembro de 2006 a março de 2007, caracterizados por estação quente e úmida. Todos os espécimes foram

capturados com licença de coleta para atividade científica emitido pelo Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis – IBAMA (Nº 13923-1). Para a estimativa da diversidade genética das populações, foram coletados 10 espécimes por localidade, totalizando 60 indivíduos.

Extração do DNA genômico

Os animais foram mortos de acordo com o protocolo recomendado para anfíbios pela Australia and New Zealand Council for the Care of Animals in Research and Teaching (2001), por meio da absorção cutânea de benzocaína administrada em dosagem letal. Na extração de DNA dos espécimes, para o preparo do DNA *template*, foram utilizados fragmentos de músculo tratados de acordo com Sambrook et al. (1989). A avaliação da integridade do DNA foi verificada em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e visualizado em luz ultravioleta. A pureza e a concentração de DNA das amostras foram estimadas em espectrofotômetro NanoDrop™ ND-1000.

Marcadores microssatélites e avaliação dos genótipos nas populações

Foram selecionados 9 *loci* polimórficos microssatélites (*Rschμ1*, *Rschμ3*, *Rschμ4*, *Rschμ6*, *Rschμ8*, *Rschμ9*, *Rschμ10*, *Rschμ12* e *Rschμ14*) desenvolvidos e padronizados de acordo com Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium et al. (2009) e assumidos como marcadores neutros.

Uma cauda M13 de sequência idêntica ao iniciador universal conjugado ao fluoróforo Cy5 foi acoplada na extremidade 5' dos iniciadores direto e a reação da PCR foi conduzida usando o método de iniciador universal descrito por Arruda et al. (2010). As reações de amplificação foram preparadas em volume total de 15 μL, contendo 25-100 ng de DNA genômico, tampão PCR 1x, 0,2 mM de cada dNTP, concentração variável de MgCl₂, 0,6 pmol de cada iniciador direto (com cauda M13) e reverso, e 1 unidade de Taq Platinum® DNA Polimerase (Invitrogen). Todas as PCRs foram executadas com as seguintes condições: 94°C por 5 min seguido por 40 ciclos de 30 s a 94°C, 45 s a temperatura de anelamento específica dos iniciadores (Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium et al. 2009), e 45 s a 72°C. Ao final desses 40 ciclos, a PCR foi interrompida a 72°C e 1 pmol de iniciador universal M13 marcado com Cy5 foi adicionado em cada reação e em seguida, as reações foram submetidas a uma nova ciclagem com 10 ciclos de 30 s a 94°C, 45 s

a 53°C, 45 s a 72°C e uma extensão final de 30 min a 72°C. Os produtos da PCR foram separados por eletroforese vertical em gel de poliacrilamida desnaturante 6% no analisador automático de DNA ALF Express II (Amersham Biosciences), utilizando padrão externo (50-500 pb) e padrões internos adequados a cada *locus*. A estimativa do tamanho dos alelos foi realizada pelo aplicativo Allele Locator 1.03 (Amersham Biosciences).

Análises estatísticas populacionais

A variabilidade intrapopulacional foi quantificada de acordo com a frequência de heterozigosidade observada e esperada usando o algoritmo de Levene (1949), e o número efetivo dos alelos (Hartl e Clark, 1989) pelo aplicativo POPGENE 1.32 (Yeh et al. 1997). O aplicativo FSTAT 2.9.3.2 (Goudet 1997) calculou a riqueza alélica corrigida pelo tamanho amostral. As populações foram examinadas para desvios significantes do equilíbrio de Hardy-Weinberg a partir do coeficiente de endogamia usando o aplicativo GENEPOP 4.0.9 (Rousset 2008), com as probabilidades de significância calculadas pelo método de cadeia Markov (Guo e Thompson 1992), com 10.000 passos de desmemorização e 100 lotes com 5.000 iterações por lote. Esse aplicativo calculou também o coeficiente de endocruzamento intrapopulacional baseado na identidade dos alelos (*F_{is}*) de acordo com Weir e Cockerham (1984).

Os níveis de diferenciação populacional foram quantificados no aplicativo ARLEQUIN 2.001 (Excoffier e Schneider 2006) a partir da estatística F pelos índices *F_{st}* e *R_{st}*, o último ajustado ao modelo *stepwise mutation model* de evolução para marcadores microssatélites (Slatkin 1995). O aplicativo GENEPOP 4.0.9 (Rousset 2008) também estimou o fluxo gênico entre as populações (número médio de migrantes de cada geração - *N_m*), usando a quantidade de alelos privados como método de análise (Barton e Slatkin 1986). Uma estimativa do número de subpopulações representativas nas amostras (*k*) foi feita usando o aplicativo STRUCTURE 2.3.1, baseado em abordagem bayesiana (Pritchard et al. 2000), executado sem informação populacional prévia. Três corridas foram realizadas com 10.000 passos e 10.000 réplicas, usando o modelo de ancestralidade compartilhada. Para as frequências de alelos foram empregados dois modelos: alelos correlacionados, que considera as frequências semelhantes entre as populações devido à migração ou ancestralidade, em que alguns alelos estão em desequilíbrio

de ligação, e o modelo de frequências independentes, que infere que as frequências alélicas em diferentes populações são razoavelmente diferentes entre si. O número populacional (k) foi sugerido a partir de um até o valor de 10.

As análises demográficas foram executadas para avaliar evidências recentes de “gargalos de garrafa” ou “efeito fundador” com programa BOTTLENECK 1.2.0.02 (Cornuet e Luikart 1996), onde as frequências alélicas foram testadas para a presença de um excesso de heterozigosidade ($H_e > H_{eq}$), que foi avaliada pelo teste unicaudal *signed rank* de Wilcoxon, mais robusto quando utilizado nas análises com menos de 20 *loci* (Piry et al. 1999). O teste foi executado com 5.000 replicações empregando os modelos *stepwise mutation model* e o modelo mutacional *two-phase model*, incorporando um sistema com 70 e 90% de *stepwise mutation model* que abrange os intervalos mais prováveis para microssatélites de anfíbios (Schlötterer 2000).

O isolamento por distância (teste de Mantel) foi avaliado pela relação entre a diferenciação genética (R_{st}) e a distância geográfica entre os pontos amostrados, e foi executado com 10.000 randomizações utilizando o aplicativo IBD 1.52 (Bohonak 2002).

Resultados

Diversidade genética das populações

A quantidade de variabilidade genética intrapopulacional foi estimada por seis diferentes parâmetros exibidos na Tabela 2. Nenhuma população apresentou desvio significativo do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 2: Índices de diversidade genética neutra intrapopulacional.

Populações	H_o	H_e	P_{HWE}	N_e	RA	F_{is}
Votuporanga	0,47	0,47	0.984	1,93	3,11	0,011
Macaubal	0,47	0,46	0.787	1,93	3,11	-0,022
S. A. Aracanguá	0,53	0,52	0.996	2,16	3,22	-0,019
Planalto	0,41	0,45	0.693	1,84	3,68	0,094
Sales	0,40	0,45	0.612	2,02	3,00	0,120
Novo Horizonte	0,46	0,48	0.824	2,17	3,22	0,055

H_o = heterozigosidade observada; H_e = heterozigosidade esperada; P_{HWE} = probabilidade de desvio (valor de p) do equilíbrio de Hardy-Weinberg; N_e = número efetivo de alelos; RA = riqueza alélica; F_{is} = coeficiente de endocruzamento intrapopulacional.

As estimativas de variabilidade genética em todos os índices avaliados foram bastante homogêneos entre as populações analisadas. Não foi constatada nenhuma

redução aparente na diversidade genética interna das populações das duas espécies. O coeficiente de endocruzamento em todas as populações foi baixo ($< 0,12$) e não significativo ($p > 0,05$) indicando reduzida endogamia a nível intrapopulacional.

Organização da variação genética entre as populações

As populações foram comparadas aos pares para detecção de dissimilaridades entre elas, com base na análise de variados parâmetros. Os índices F_{st} e R_{st} de diferenciação genética interpopulacional (Tabela 3) exibiram valores correlacionados e evidenciaram uma baixa a moderada estruturação genética entre as populações par a par. Os menores valores, de R_{st} e F_{st} e sem significância estatística ($p > 0,05$), foram observados entre os pares populacionais de Sales e Novo Horizonte, Votuporanga e S. A. Aracanguá, e nas comparações das populações de Macaubal com as populações de Sales e Novo Horizonte.

Tabela 3: Estimativas de F_{st} e R_{st} (entre parênteses) entre as populações.

Populações	Votutoranga	Macaubal	S. A. Aracanguá	Planalto	Sales
Macaubal	0,057* (0,061)				
S. A. Aracanguá	0,015 (0,015)	0,042* (0,044)			
Planalto	0,030* (0,031)	0,090* (0,099)	0,068* (0,072)		
Sales	0,043* (0,045)	0,021 (0,021)	0,057* (0,061)	0,051* (0,054)	
Novo Horizonte	0,033* (0,035)	0,013 (0,013)	0,058* (0,062)	0,039* (0,041)	-0,002 (0,000)

* = Valores de p significantes.

A espécie exibiu um número reduzido de alelos privados nas populações (2,96% em média) distribuídos uniformemente entre elas (3,45 até 3,7%), a exceção da população de Planalto que não exibiu alelo privado. O cálculo do número médio de migrantes por geração (Tabela 4) evidenciou um fluxo gênico alto entre as populações de *R. schneideri* ($N_m = 3,58$ nas populações agrupadas). Nas comparações par a par, os valores foram todos praticamente acima de 1 indivíduo, a exceção da comparação Novo Horizonte – Santo Antônio do Aracanguá ($N_m = 0,746$).

Tabela 4: Estimativa do número médio de migrantes (N_m) entre as populações, após o ajuste por tamanho populacional.

Populações	Votutoranga	Macaubal	S. A. Aracanguá	Planalto	Sales
Macaubal	1,655				
S. A. Aracanguá	1,726	0,971			
Planalto	2,886	3,109	1,437		
Sales	1,259	2,154	0,936	1,988	
Novo Horizonte	1,054	2,134	0,746	2,710	2,268

A análise bayesiana pelo STRUCTURE 2.3.1 forneceu as probabilidades de agrupamentos populacionais. De acordo com a curva de probabilidade (Gráfico 1), o aplicativo agrupou todas as populações de *R. schneideri* em um único grupo pelos modelos de frequências alélica independente ($k = 1$ $Ln = -1013$; $k = 2$, $Ln = -1019$; $k = 3$ $Ln = -1035$; $k = 4$ $Ln = -1095$; média das três corridas) e correlacionada ($k = 1$ $Ln = -1013$; $k = 2$, $Ln = -1077$; $k = 3$ $Ln = -1094$; $k = 4$ $Ln = -1129$; média das três corridas).

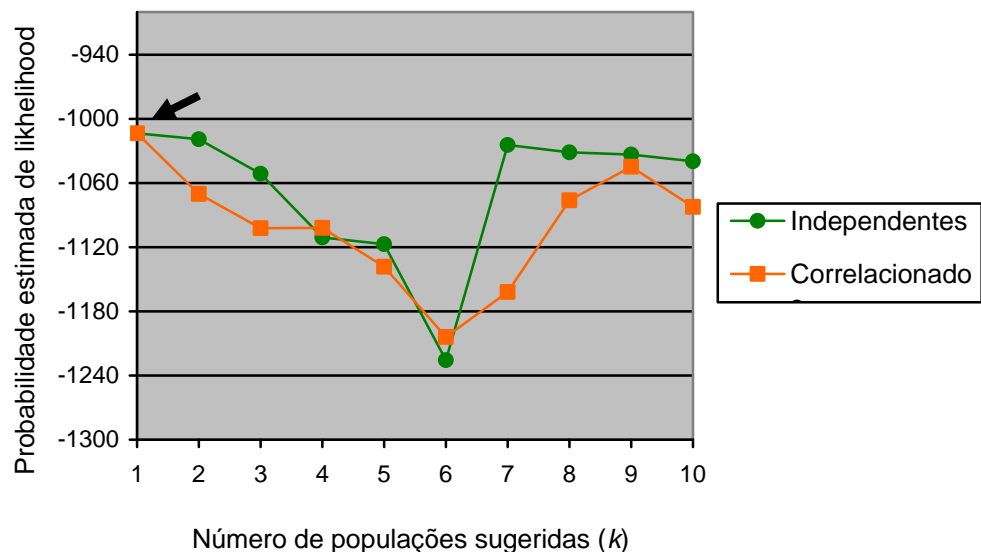


Gráfico 1: Curva de probabilidade produzida pelo aplicativo Structure 2.3.1 indicando o número provável de agrupamentos populacionais pelo modelo de ancestralidade compartilhada com frequência de alelos correlacionados e independentes. Seta indica o número mais provável ($k = 1$ para ambas as frequências de alelos).

Histórico demográfico

O teste Mantel baseado no índice R_{st} não detectou valores significantes de distância genética associada à distância geográfica ($r_{mantel} = 0,335798$; $p = 0,1540$). Enquanto que evidências de reduções recentes não foram detectadas (Tabela 5) para

nenhuma das seis populações, pelos três modelos evolutivos de alelos utilizando (S.M.M.; T.P.M. 70%; T.P.M. 90%) no teste Wilcoxon *sign-rank*.

Tabela 5: Resultados do teste Wilcoxon *sign-rank* unicaudal (valores de *p*) gerados pelo programa BOTTLENECK 1.2.0.02 com 10.000 réplicas com os modelos S.M.M. e T.P.M. 70% e 90% de S.M.M.

Populações	Modelos evolutivos		
	S.M.M.	T.P.M. (70%)	T.P.M. (90%)
Votuporanga	0,93555	0,63281	0,82031
Macaubal	0,89844	0,75195	0,82031
S. A. Aracanguá	0,82031	0,50000	0,71484
Planalto	0,99707	0,99707	0,99707
Sales	0,71484	0,63281	0,67383
Novo Horizonte	0,80859	0,52734	0,62891

S.M.M. = *stepwise mutation model*; T.P.M. = *two-phase model*.

Discussão

As perturbações antrópicas circundantes aos habitats naturais são consideradas fatores locais e globais no declínio dos anfíbios, como consequência direta da redução na disponibilidade de habitat, que é particionado em fragmentos discretos rodeados por uma matriz muitas vezes inabitável ou intransitável por processos antropogênicos (Bennet 1999). Esses fragmentos são frequentemente pequenos e isolados e, portanto, a fragmentação pode causar uma perda de diversidade genética por meio dos processos de deriva genética e endogamia (Hansk e Gilpin 1997; Hedrick 2001; Keller e Waller 2002). Populações de anfíbios podem ser especialmente mais propensas à extinção local resultante da transformação e fragmentação do habitat causada pela ação humana, devido à dinâmica espacial e temporal das populações (Gibbs 1998) e de suas características morfofisiológicas.

Os efeitos negativos da fragmentação do habitat sobre os níveis de variabilidade genética nas populações locais têm sido indicados em vários estudos de anfíbios (e.g. Arruda 2008; Hitching e Beebee, 1997; Hitchings e Beebee, 1998).

Todas as populações de *R. schneideri* amostradas exibiram uma variabilidade genética uniforme e baixa endogamia, sendo observados níveis baixos ou ausentes de organização estrutural nas populações pelos diferentes métodos de análises (*F_{st}*, *R_{st}*, *N_m* e Structure).

Scribner et al. (1994), em análise de fina escala com marcadores microsatélites em populações de *Bufo bufo* (Bufonidae) distantes até 14 Km,

detectaram valores baixos de estruturação genética (F_{st} 0.016) nessa espécie generalista. Outra espécie de bufonídeo, *Epidalea calamita* que atualmente sofre um declínio populacional (Beja et al. 2009), foi avaliada por Rowe et al. (2000) com marcadores microssatélites, que evidenciaram estruturação (F_{st} 0.060 - 0.224) em populações distantes até 16 km. Os valores do F_{st} para *R. schneideri* no presente estudo, oscilaram de -0,002 até 0,09 entre fragmentos distantes de 24 até 138 Km. Portanto, concluímos que a estruturação foi ausente ou bastante pobre nesse estudo, mesmo em média escala.

R. schneideri é uma espécie amplamente disseminada na América do Sul, com elevada abundância em paisagens antropizadas e de hábitat generalista (Cochran 1955; Silvano e Pimenta 2003). A ausência de isolamento por distância é comumente interpretada como significando a ocorrência de fluxo gênico elevado a grandes distâncias (Seppa e Laurila 1999) ou muito baixo, mesmo a distâncias curtas (Shaffer et al. 2000; Olsen et al. 2003). Em nosso estudo, a ausência de isolamento por distância observada em *R. schneideri* e os níveis altos de N_m , sugerem um potencial elevado de dispersão (grande potencial panmítico), responsável pela homogeneização das populações em que foi verificada ausência de estruturação; esses dados são coerentes com o *status* da espécie. Aparentemente, os processos antropogênicos das áreas avaliadas nesse estudo, incluindo os fortes impactos produzidos por práticas agrícolas de monoculturas densas (e.g. cana de açúcar), não são fragmentadores de hábitat para essa espécie.

De acordo com Haddad e Abe (1999), como consequência do desmatamento, *R. schneideri* tem expandido geograficamente seus limites tornando-se particularmente interessante para estudos de eventos fundador (Colli et al. 2002; Whiteley et al. 2006). Contudo, em nossos resultados nenhum evento fundador recente foi detectado, indicando o estabelecimento histórico das populações nessa região.

Implicações conservacionistas

Caracterizada por ampla distribuição, tolerância a uma vasta gama de hábitats e com uma tendência de aumento populacional, a espécie *R. schneideri* não está atualmente ameaçada (Aquino et al. 2004). Os resultados reportados nesse estudo não indicaram declínio na variabilidade genética entre as populações das

regiões avaliadas, mesmo sob forte impacto antrópico, estando de acordo com os estudos que apontam a adaptabilidade da espécie a distúrbios antropogênicos.

Em alguns casos a hibridização pode comprometer a sustentabilidade das espécies parentais. Esta ameaça à biodiversidade surge especialmente após translocações antrópicas, como nos exemplos bem relatados com rãs européias (Beebee, 2005). Logo, o exame da hibridização é um aspecto bastante relevante para gestores de conservação. Kloss (1972) e Haddad et al. (1990) reportaram a existência de formas intermediárias entre *R. schneideri* e *R. icterica* entre zonas de transição. Com objetivo de elucidar essa relação entre as espécies, alguns estudos foram conduzidos por marcadores citogenéticos (Kasahara et al. 1996) e protéicos (Azevedo et al. 2003). Entretanto, para estudos mais refinados de hibridizações naturais, marcadores moleculares mais sensíveis como os microsatélites são altamente recomendados. Com isso, apontamos que a medida de ação atual é a determinação do *status* taxonômico dessa espécie (ou complexo de espécies) em zonas de transição com vistas a planejamentos futuros de conservação, caso necessário.

Agradecimentos

Estamos gratos a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro. CNPq apoiou também com subsídios 152757/2007-4 o autor Evonnildo Costa Gonçalves.

Referências

- Aquino L, Reichle S, Colli G et al (2004) *Rhinella schneideri*. In: IUCN 2009. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2009.1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 28 July 2009
- Alford RA, Richards SJ (1999) Global amphibian declines: a problem in applied ecology. *Annu Rev Ecol Syst* 30:133-165
- Arruda MP; Morielle-Versute E (2008) Cytogenetic and random amplified polymorphic DNA analysis of *Leptodactylus* species from rural and urban environments (Anura, Amphibia). *Genet Mol Res* 7(1):161-176
- Arruda MP, Gonçalves EC, Schneider MPC et al (2010) An alternative genotyping method using dye-labeled universal primer to reduce unspecific amplifications. *Mol Biol Rep* 37:2031-2036
- Australia and New Zealand Council for the Care of Animals in Research and Teaching "ANZCCART" (2001) Euthanasia of Animals Used for Scientific Purposes. 2th ed. Australia and New Zealand: Reilly JS (Eds.)

- Azevedo MFC, Foresti F, Ramos PRR et al (2003) Comparative cytogenetic studies of *Bufo ictericus*, *B. paracnemis* (Amphibia, Anura) and an intermediate form in sympatry. *Genet Mol Biol* 26:289-294
- Barton NH, Slatkin M (1986) A quasi-equilibrium theory of the distribution of rare alleles in a subdivided population. *Heredity* 56:409-415
- Bastos RP, Motta JAO, Lima LP et al (2003) *Anfíbios da Floresta Nacional de Silvânia*, Goiânia, Goiás, Brazil
- Beebee TJC (2005) Conservation genetics of amphibians. *Heredity* 95:423-427
- Beja P, Kuzmin S, Beebee T et al (2008). *Epidalea calamita*. In: IUCN 2009. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2009.1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 28 July 2009
- Bennett AF (1999) *Linkages in the Landscape: the Role of Corridors and Connectivity in Wildlife Conservation*. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK
- Bohonak AJ (2002) IBD (isolation by distance): a program for analyses of isolation by distance. *J Hered* 93:154–155
- Cochran DM (1955) Frogs of southeastern Brazil. *US Nat Mus Bull* 206:1-411
- Colli GR, Bastos RP, Araújo AFB (2002) The character and dynamics of Cerrado herpetofauna, in the Cerrado of Brazil: *ecology and natural history of a neotropical Savanna*, edited by Oliveira PS & Marquis RJ. Columbia University Press, New York
- Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144:2001–2014
- Cushman SA (2006). Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: a review and prospectus. *Biol Conserv* 128:231-240
- Ewers RM (2005) Are conservation and development compatible? *Trends Ecol Evol* 20:159
- Excoffier IG, Schneider S (2006) Arlequin 3.1: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50
- Ficetola GF, Bernardi FD (2004) Amphibians in a human-dominated landscape: the community structure is related to habitat features and isolation. *Biol Conserv* 119:219-230
- Frankham R (1996) Relationship of genetic variation to population size in wildlife. *Conserv Biol* 10:1500-1508
- Gardner TA, Barlow J, Peres CA (2007) Paradox, presumption and pitfalls in conservation biology: The importance of habitat change for amphibians and reptiles. *Biol Conserv* 138:166-179
- Gibbs J (1998) Distribution of woodland amphibians along a forest fragmentation gradient. *Landscape Ecol* 13:263-268
- Goudet J (1997) FSTAT: A Program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices. 2.8. Switzerland: Université de Lausanne
- Gray MJ, Smith LM, Brenes R (2004) Effects of agricultural cultivation on demographics of southern high plains amphibians. *Conserv Biol* 18:1368-1377
- Guix JC (1993) Hábitat y alimentación de *Bufo paracnemis* en una región semiárida del nordeste de Brasil, durante el período de reproducción. *Revista Española Herpetología* 7:65-73
- Guo SW, Thompson EA (1992) Performing the exact test of Hardy–Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48:361-372

- Haddad CFB, Cardoso AJ, Castanho LM (1990) Híbridação natural entre *Bufo ictericus* e *Bufo crucifer* (Amphibia: Anura). Rev Bras Biol 50(3):739-744
- Haddad CFB, Abe AS (1999) Anfíbios e Répteis. In: Workshop Mata Atlântica e Campos Sulinos
- Hanski IA, Gilpin ME (1997) *Metapopulation Biology: Ecology, Genetics, and Evolution*. Academic Press, San Diego
- Hartl DL, Clark AG (1989) Principles of population genetics. 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA
- Hedrick PW (2001) Conservation genetics: where are we now? Trends Ecol Evol 16:629-636
- Henle K, Davies KF, Kleyer M et al (2004) Predictors of species sensitivity to fragmentation. Biodivers Conserv 13:207-251
- Hitchings SP, Beebee TJC (1997) Genetic substructuring as a result of barriers to gene flow in urban *Rana temporaria* (common frog) populations: implications for biodiversity conservation. Heredity 79:117-121
- Hitchings SP, Beebee TJC (1998) Loss of genetic diversity and fitness in common toad (*Bufo bufo*) populations isolated by inimical habitat. J Evolution Biol 11: 269-283
- Johansson M, Primmer CR, Sahlsten J et al (2005) The influence of landscape structure on occurrence, abundance and genetic diversity of the common frog, *Rana temporaria*. Glob Change Biol 11:1664-1679
- Kasahara S, Silva APZ, Haddad CFB (1996) Chromosome banding in three species of Brazilian toads (Amphibia - Bufonidae). Rev Bras Genet 19(2):237-242
- Keller LF, Waller DM (2002) Inbreeding effects in wild populations. Trends Ecol Evol 17:230-241
- Kloss GR (1972) Os Rhabdias dos *Bufo* do grupo Marinus. Um estudo de espécies crípticas (Nematoda: Rhabditoidea). Doctoral thesis, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil
- Knutson MG, Sauer JR, Olsen DA et al (1999) Effects of landscape composition and wetland fragmentation on frog and toad abundance and species richness in Iowa and Wisconsin, U.S.A. Conserv Biol 13(6):1437-1446
- Kronka FJN, Matsukuma CK, Nalon MA et al (1993) Inventário florestal do Estado de São Paulo. Instituto Florestal: São Paulo
- Levene H (1949) On a matching problem in genetics. Ann Math Stat 20:91-94
- Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium, Almany GR, Arruda MP et al. (2009) Permanent Genetic Resources added to Molecular Ecology Resources Database 1 May 2009–31 July. Mol Ecol Resour 9(6):1460-1466
- Olsen JB, Miller SJ, Spearman WJ et al (2003) Patterns of intra- and inter-population genetic diversity in Alaskan coho salmon: Implications for conservation. Conserv Genet 4:557–569
- Piry S, Luikart GE, Cornuet JM (1999) BOTTLENECK: a computer program for detecting reductions in the effective size using allele frequency. J Hered 90:502-503
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155:945–959
- Reed DH, Frankham R (2003) Correlation between fitness and genetic diversity. Conserv Biol 17:230-237
- Rousset F (2008) GENEPOP'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. Mol Ecol Resour 8:103-106

- Rowe G, Beebee TJC, Burke T (2000) A microsatellite analysis of natterjack toad, *Bufo calamita*, metapopulations. *Oikos* 88:641-651
- Sala OE, Chapin FSI, Armesto JJ et al (2000) Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science* 287:1770-1774
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning - a laboratory manual. 2th ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Schlötterer C (2000) Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109:365-371
- Shaffer HB, Fellers GM, Magee A et al (2000) The genetics of amphibian declines: population substructure and molecular differentiation in the Yosemite toad, *Bufo canorus* (Anura Bufonidae) based on single-strand conformation polymorphism analysis (SSCP) and mitochondrial DNA sequence data. *Mol Ecol* 9:245-257
- Scribner KT, Arntzen JW, Burke T (1994) Comparative analysis of intra- and interpopulation genetic diversity in *Bufo bufo*, using allozyme, single-locus microsatellite, minisatellite, and multilocus minisatellite data. *Mol Biol Evol* 11: 737-748
- Seppa P, Laurila A (1999) Genetic structure of island populations of the anurans *Rana temporaria* and *Bufo bufo*. *Heredity* 82:309-317
- Shaffer HB, Fellers GM, Magge A et al (2000) The genetics of amphibian declines: population substructure and molecular differentiation in the Yosemite Toad, *Bufo canorus* (Anura, Bufonidae) basead on single-strand conformation polymorphism analysis (SSCP) DNA mitochondrial DNA sequence data. *Mol Ecol* 8:245-257
- Silvano DL, Pimenta BVS (2003) Diversidade e distribuição de anfíbios anuros na Mata Atlântica do sul da Bahia. In: Prado PI, Landau EC, Moura RT, Pinto LPS, Fonseca GAB, Alger K (orgs.) Corredor de Biodiversidade na Mata Atlântica do Sul da Bahia. Published on CD-ROM, Ilhéus, IESB / CI / CABS / UFMG / UNICAMP
- Slatkin M (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139:457-462.
- Urbina-Cardona JN, Olivarez-Pérez M, Reynoso VH (2006) Herpetofauna diversity and microenvironment correlates across a pasture-edge-interior ecotone in tropical rainforest fragments in the Los Tuxtlas Biosphere Reserve of Veracruz, México. *Biol Conserv* 132:61-75
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370
- Whiteley AR, Spruell P, Allendorf FW (2006) Can common species provide valuable information for conservation? *Mol Ecol* 35:2767-2786
- Yeh FC, Yang R, Boylet T (1997) POPGENE Version 1.32: Software Microsoft Window-Based Freeware for Population Genetic Analysis. University of Alberta, Alberta, Canada
- Young A, Boyle T, Brown T (1996) The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends Ecol Evol* 11:413-418
- Young AG, Brown ADH, Murray BG et al (2000) Genetic erosion, restricted mating and reduced viability in fragmented populations of the endangered grassland herb *Rutidosia leptorhynchoidea*. In: *Genetics, Demography and Viability of Fragmented Populations* (eds Young AG, Clarke GM), pp. 335-359. Cambridge University Press, Cambridge, UK

2.2 ARTIGO 2

Empobrecimento genético de populações de anfíbios em ambientes fortemente perturbados por culturas agropecuárias

Maurício P. ARRUDA¹, Evonnildo C. GONÇALVES², Artur SILVA², Maria Paula Cruz SCHNEIDER², and Eliana MORIELLE-VERSUTE¹

¹Laboratório de Chiroptera, Departamento de Zoologia e Botânica, UNESP - Universidade Estadual Paulista – Campus de São José do Rio Preto.

²Laboratório de Polimorfismo de DNA, Instituto de Ciências Biológicas, UFPA - Universidade Federal do Pará.

Resumo

A fragmentação e a destruição do hábitat são aceitas como sendo as causas primárias para o declínio populacional dos anfíbios. Diversos processos antropogênicos contribuem para a deterioração das paisagens, podendo afetar negativamente as populações de anfíbios, por alterar fisicamente os ambientes aquáticos e terrestres, reduzindo a conectividade dos habitats. Contudo, poucos dados existem sobre os efeitos do cultivo agrícola para as populações de anfíbios. Assim, foi avaliada a variabilidade genética de populações de duas espécies (*Hypsiboas raniceps* e *Leptodactylus chaquensis*) provenientes de habitats com diferentes tipos de perturbação antrópica (áreas abertas de pastagem vs agricultura) por meio de marcadores microssatélites, com o intuito de relacionar o impacto de diferentes matrizes antrópicas sobre a diversidade genética. As populações das duas espécies localizadas em região com forte impacto agrícola (Tietê Batalha), exibiram empobrecimento genético e alta estruturação populacional (F_{st} , R_{st} , AMOVA, e análise bayesiana) em relação às outras populações. É possível concluir que as práticas agrícolas de monoculturas densas (e.g. cana-de-açúcar) têm efeitos depressivos na diversidade genética em anfíbios, quando essas culturas ocasionam uma redução da dispersão das espécies (mais provável em espécies com baixa vagilidade) e, dessa forma contribuindo para a fragmentação do hábitat. Possíveis implicações conservacionistas foram elaboradas.

Introdução

Atualmente a classe Amphibia está submetida a grandes declínios mundiais, com pelo menos um terço das espécies consideradas “ameaçadas” sob critérios da IUCN e, a menos que estes declínios sejam compreendidos e revertidos, centenas de espécies podem ser extintas nas próximas décadas (Stuart *et al.* 2004). A deterioração nas paisagens ocorre em escala local e global, podendo afetar negativamente as populações de anfíbios de diversas maneiras por alterar fisicamente os ambientes aquáticos e terrestres (Alford *et al.* 2001). Uma dessas perturbações, a mecânica (e.g. práticas agrícolas, estradas, pastagens), pode afetar a conectividade das populações influenciando na permeabilidade do movimento entre as demes (Gibbs 1998) e estruturando geneticamente as populações (Reh e Seitz 1990). Contudo, poucos dados existem (e.g. Knutson *et al.* 1999; Kolozsvary e Swihart 1999; Gray *et al.* 2004) sobre os efeitos do cultivo agrícola para as populações de anfíbios, embora seja geralmente aceito que a agricultura influencie negativamente as populações de anfíbios (Semlitsch 2000, Smith *et al.* 2004), promovendo declínios na diversidade e abundância das espécies, alterações na composição de espécies e parâmetros demográficos e diminuição da diversidade genética (Sauders *et al.* 1991; Turner 1996; Oldham *et al.* 2000; Joly *et al.* 2001; Laurance *et al.* 2002; Ficetola e De Bernardi, 2004). Há evidências sugerindo que algumas guildas de anfíbios podem reproduzir-se em zonas úmidas de paisagens perturbadas (Hecnar e M'Closkey 1997; Wright *et al.* 1998) e, portanto, podem ser positivamente associadas com o cultivo agrícola em escala local, mas outros parâmetros demográficos e de adaptabilidade (e.g. demografia temporal, tamanho do corpo e diversidade da dieta) podem ser afetados negativamente (Gray *et al.* 2004).

A diversidade genética detectada por marcadores moleculares neutros do tipo microssatélites em grande parte está associada com a aptidão das populações e o risco de extinção (Frankham 2005); assim, podem ser aplicados na detecção de populações pequenas ameaçadas. Diversos estudos têm detectado uma redução na aptidão dos indivíduos de populações onde a diversidade genética tem sido negativamente afetada pela fragmentação (e.g. Hitching e Beebee, 1998; Andersen *et al.* 2004; Edman *et al.* 2004; Galeuchet *et al.* 2005). Os dados genéticos podem também ser usados para sugerir níveis de dispersão, contribuindo para uma maior compreensão da dinâmica das populações de anfíbios, fornecendo novas

informações sobre a estrutura populacional, padrões de migração e na identificação de barreiras geográficas para a dispersão (Newman e Squire 2001). Anfíbios frequentemente sobrevivem dentro de metapopulações (Marsh e Trenham 2001), e a perda de aptidão causada pelo isolamento aumenta o risco de extinção de (sub) populações (Beebee e Rowe 2000).

De todos os biomas brasileiros, os mais ameaçados são a Mata Atlântica, onde os remanescentes florestais representam 8% da cobertura original (Fundação SOS Mata Atlântica 2002) e, o Cerrado considerado um dos *hotspots* mundiais de biodiversidade, em que a taxa de conversão do hábitat é muito elevada, restando apenas 34% da cobertura original (Klink e Machado 2005). O aumento das taxas de declínio das populações de anuros em todo o mundo cria demandas urgentes de estratégias para maximizar os esforços de conservação. A alteração do hábitat pode ser crítica em regiões para as quais poucos dados detalhados sobre a diversidade, abundância e distribuição estão disponíveis (Young *et al.* 2000), podendo implicar na perda rápida de muitas populações e espécies.

O noroeste do estado de São Paulo representa uma das últimas áreas de ocupação do território paulista que experimentou uma rápida e desordenada expansão urbana e agrícola nas recentes décadas, com grave comprometimento ambiental. Com uma vegetação original caracterizada como Floresta Estacional Semidecidual e Savana (Cerrado), ocupam atualmente somente 4% de sua área original (SMA/IF 2005), tendo sido substituída por pastagens, culturas diversas ou áreas urbanas (Probio 1998). Essa região tem os maiores índices de conversão de habitats naturais em terra agrícolas do estado, colocando a área como a mais desmatada e fragmentada (IPT 2000), e essas práticas tem um potencial de grande influência sobre as populações de anfíbios devido a problemas de perda de habitats, isolamento e contaminação química e de nutrientes.

Os esforços dos programas de conservação para uma espécie não protegem adequadamente as necessidades biológicas de múltiplas espécies ameaçadas dentro dos ecossistemas. Consequentemente existe uma forte tendência, em estratégias de conservação, na substituição de estudos únicos de uma espécie, para abordagens mais amplas com diferentes espécies (Roberge e Angelstam 2004), particularmente muito mais informativos para a conservação do ecossistema como um todo. Além disso, nos anfíbios por sua natureza altamente filopátrica, os padrões de abundância, diversidade e ocupação podem fornecer indicadores mais confiáveis

de qualidade do hábitat do que os outros táxons de vertebrados (Waldman e Tocher 1998).

Assim, em nosso trabalho, avaliamos a diversidade genética por meio de marcadores microssatélites neutros, em populações de uma rã (*Leptodactylus chaquensis*) e uma perereca (*Hypsiboas raniceps*), em habitats com diferentes tipos de perturbação antrópica (práticas agrícolas e pastagem) na região noroeste do estado de São Paulo, Brasil, com o intuito de relacionar o impacto de diferentes matrizes sobre a variabilidade genética das espécies.

Métodos

Áreas de estudo e espécies

Esse estudo foi realizado em seis localidades pertencentes à região Noroeste do estado de São Paulo, Brasil (Figura 1). Essas localidades estão sob influência de bacias hidrográficas, que variam quanto ao tipo de impacto antrópico predominante: bacia do Baixo Tietê (quatro populações examinadas: Votuporanga, Santo Antônio do Aracanguá, Planalto e Macaúbal) caracterizada pela presença de pecuária extensiva (áreas abertas) e bacia do Tietê Batalha (duas populações: Sales e Novo Horizonte), onde predomina áreas de cultivo da cana-da-açúcar (monocultura densa). As áreas são compostas por açudes, brejos e lagoas (Tabela 1) em locais de transição entre savana e floresta Atlântica tropical, distantes aproximadamente 400 km do litoral brasileiro. O hilídeo arborícola *H. raniceps* e o leptodactylídeo *L. chaquensis* foram escolhidos para a avaliação da diversidade genética nas diferentes localidades. Essas espécies predominantemente de formações abertas (Gordo e Campos 2005; Uetanabaro *et al.* 2008) são extensamente dispersas na América do Sul colonizando diferentes biomas (Duellman 1999; La Marca *et al.* 2004). Espécies que são localmente abundantes, extensamente distribuídas podem servir como organismos informativos para avaliar processos de fragmentação da paisagem e da perda de habitats (Whiteley *et al.* 2006).

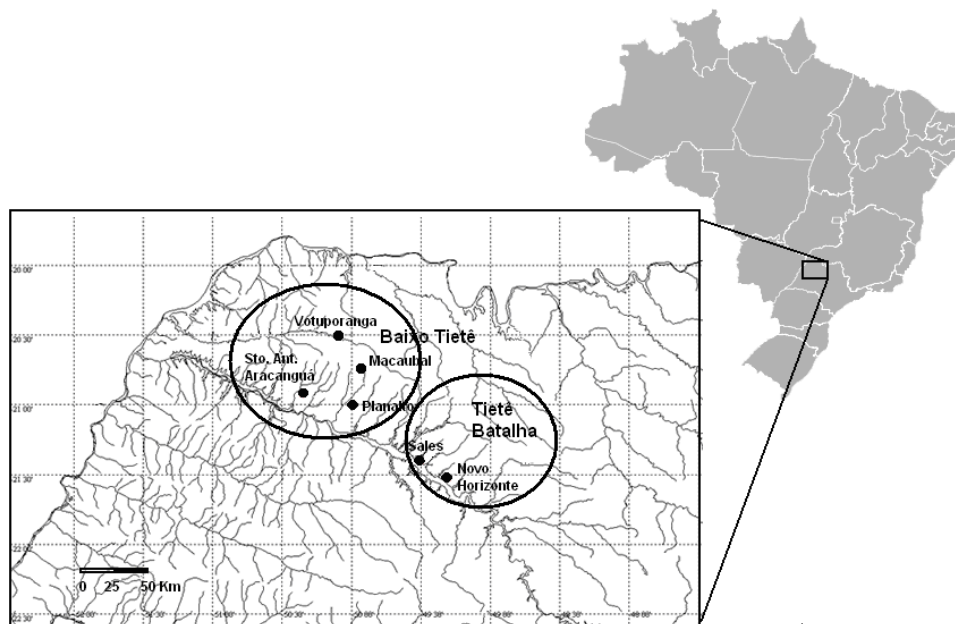


Figura 1: Pontos amostrados da região Noroeste do Estado de São Paulo, Brasil.

Tabela 1: Coordenadas geográficas e caracterização da paisagem ambiental das áreas amostradas.

Município	Bacia Hidrográfica	Latitude	Longitude	Matriz predominante
Votuporanga	BT	20°30'17.36"S	50°05'42.67"O	Pasto
Macaúbal	BT	20°44'44.34"S	49°56'17.64"O	Pasto
S. A. Aracanguá	BT	20°55'47.25"S	50°21'16.34"O	Pasto
Planalto	BT	20°59'31.28"S	49°58'48.59"O	Pasto
Sales	TB	21°24'39.73"S	49°28'32.64"O	Cana-de-açúcar
Novo Horizonte	TB	21°30'08.16"S	49°18'32.35"O	Cana-de-açúcar

BT = Baixo Tietê; TB = Tietê Batalha

As coletas foram realizadas durante a estação reprodutiva, compreendida entre Setembro de 2006 e Março de 2007 (estação quente e chuvosa). Todos os espécimes foram capturados com licença de coleta para atividade científica emitido pelo Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis – IBAMA (Nº 13923-1). No total, foram coletadas amostras de tecido muscular de 60 indivíduos adultos de cada espécie, provenientes de seis localidades (10 espécimes de cada espécie por localidade) separadas por distâncias de 24 a 138 Km.

Extração do DNA genômico

Os animais foram mortos de acordo com o método recomendado para anfíbios pela Australia and New Zealand Council for the Care of Animals in Research and Teaching (2001), por meio da absorção cutânea de benzocaína administrada em dosagem letal. O DNA foi extraído das amostras de acordo com o protocolo

padrão descrito por Sambrook *et al.* (1989). A avaliação da integridade do DNA foi verificada em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e visualizado em luz ultravioleta. A pureza e a concentração de DNA das amostras foram estimadas em espectrofotômetro NanoDrop™ ND-1000.

Genotipagem dos marcadores microssatélites

Dez *loci* microssatélites para a espécie *H. raniceps* (*Hraniμ02*, *Hraniμ03*, *Hraniμ04*, *Hraniμ05*, *Hraniμ06*, *Hraniμ07*, *Hraniμ10*, *Hraniμ11*, *Hraniμ13*, *Hraniμ16* - desenvolvidos por Arruda *et al.* 2010a), e doze *loci* desenvolvidos para espécie *L. chaquensis* (*Lchaqμ01*, *Lchaqμ04*, *Lchaqμ05*, *Lchaqμ06*, *Lchaqμ07*, *Lchaqμ08*, *Lchaqμ09*, *Lchaqμ10*, *Lchaqμ13*, *Lchaqμ14*, *Lchaqμ15*, *Lchaqμ16* - Arruda *et al.* 2010b), assumidos como marcadores neutros, foram selecionados para amplificação nos indivíduos.

Uma cauda M13 de sequência idêntica ao iniciador universal conjugado com fluoróforo Cy5, foi acoplada na extremidade 5' dos iniciadores diretos, e a reação da PCR foi conduzida usando o método de iniciador universal descrito por Arruda *et al.* (2010c). As reações de amplificação foram preparadas em volume total de 15 μL, contendo 25 ng de DNA genômico, tampão PCR 1x, 0,2 mM de cada dNTP, concentração variável de MgCl₂, 0,6 pmol de cada iniciador direto (com cauda M13) e reverso, e 1 unidade de Taq Platinum® DNA Polimerase (Invitrogen). Todas as PCRs foram executadas com as seguintes condições: 94°C por 5 min seguido por 40 ciclos de 30 s a 94°C, 45 s a temperatura de anelamento específica dos iniciadores, e 45 s a 72°C. Ao final desses 40 ciclos, a PCR foi interrompida a 72°C e 1 pmol de iniciador universal M13 marcado com Cy5 foi adicionado em cada reação e em seguida, as reações foram submetidas a uma nova ciclagem com 10 ciclos de 30 s a 94°C, 45 s a 53°C, 45 s a 72°C e uma extensão final de 30 min a 72°C. Os produtos da PCR foram separados por eletroforese vertical em gel de poliacrilamida desnaturante 6% no analisador automático de DNA ALF Express II (Amersham Biosciences), utilizando padrão externo (50-500 pb) e padrões internos adequados a cada *locus*. A estimativa do tamanho dos alelos foi realizada pelo aplicativo Allele Locator 1.03 (Amersham Biosciences).

Análises dos dados

Diversidade genética dentro das populações

A variabilidade intrapopulacional foi quantificada de acordo com a frequência de heterozigosidade observada e esperada usando o algoritmo de Levene (1949) e o número efetivo dos alelos (Hartl e Clark 1989) pelo aplicativo POPGENE 1.32 (Yeh *et al.* 1997). O aplicativo FSTAT 2.9.3.2 (Goudet 1997) calculou a riqueza alélica corrigida pelo tamanho amostral e os valores divergentes testados entre as populações por 1.000 permutações com nível de significância. As populações foram examinadas para desvios significantes do equilíbrio de Hardy-Weinberg a partir do coeficiente de endogamia usando o aplicativo GENEPOP 4.0.9 (Rousset 2008), com as probabilidades de significância calculadas pelo método de cadeia Markov (Guo e Thompson 1992), com 10.000 passos de desmemorização e 100 lotes com 5.000 iterações por lote. Esse aplicativo calculou também o coeficiente de endocruzamento intrapopulacional baseado na identidade dos alelos (F_{is}), de acordo com Weir e Cockerham (1984).

Diferenciação populacional

Os níveis de diferenciação populacional foram quantificados no aplicativo ARLEQUIN 2.001 (Excoffier e Schneider 2006) a partir da estatística F pelos índices F_{st} e R_{st} , o último ajustado ao modelo *stepwise mutation model* de evolução para marcadores microssatélites (Slatkin 1995). O aplicativo GENEPOP 4.0.9 (Rousset 2008) estimou o fluxo gênico entre as populações (número médio de migrantes de cada geração - N_m), usando a quantidade de alelos privados como método de análise (Barton e Slatkin 1986), corrigido pelo tamanho amostral. Uma estimativa do número de subpopulações representativas nas amostras (k) foi feita usando o aplicativo STRUCTURE 2.3.1, baseado em abordagem bayesiana (Pritchard *et al.* 2000), executado sem informação populacional prévia. Três corridas foram realizadas com 10.000 passos e 10.000 réplicas, usando o modelo de ancestralidade compartilhada. Para as frequências de alelos foram empregados dois modelos: alelos correlacionados, que considera as frequências semelhantes entre as populações devido à migração ou ancestralidade, em que alguns alelos estão em desequilíbrio de ligação, e o modelo de frequências independentes, que infere que as frequências alélicas em diferentes populações são razoavelmente diferentes entre si. O número populacional (k) foi sugerido a partir de um até o valor de 10. Os

agrupamentos definidos pelo STRUCTURE foram comparados pela análise da variância molecular “AMOVA” embutido no aplicativo ARLEQUIN 2.001 (Excoffier e Schneider 2006), baseado no índice de variância entre grupos (F_{ct}).

Análises demográficas

Para avaliar evidências recentes de “gargalos de garrafa” ou “efeito fundador” foi executado o programa BOTTLENECK 1.2.0.02 (Cornuet e Luikart 1996), onde as frequências alélicas foram testadas para a presença de um excesso de heterozigosidade ($H_e > H_{eq}$), que foi verificado pelo teste unicaudal *signed rank* de Wilcoxon, mais robusto quando utilizado em análises com menos de 20 *loci* (Piry *et al.* 1999). O teste foi executado com 5.000 replicações empregando os modelos *stepwise mutation model* e o modelo mutacional *two-phase model*, empregando um sistema de 70 e 90% de *stepwise mutation model* que abrange os intervalos mais prováveis para microssatélites de anfíbios Schlötteter (2000).

O isolamento por distância (teste de Mantel) foi avaliado pela relação entre a diferenciação genética (R_{st}) e a distância geográfica entre os seis pontos amostrados, e foi executado com 10.000 randomizações utilizando o aplicativo IBD 1.52 (Bohonak 2002).

Resultados

Diversidade genética intrapopulacional

Do total de 22 *loci* empregados nesse estudo, excluímos das análises populacionais o *locus* *Lchaq10* desenvolvido para a espécie *L. chaquensis*, que não amplificou em muitos indivíduos, e que poderia ocasionar viés nas análises populacionais.

A quantidade de variabilidade genética interna nas populações das duas espécies foi estimada por diferentes parâmetros exibidos na Tabela 2. Nenhuma população apresentou desvio significativo do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 2: Índices de diversidade genética neutra intrapopulacional.

Espécies	Populações	Ho	He	P_{HWE}	Ne	RA	F _{is}
<i>L. chaquensis</i>	Votuporanga	0,54	0,57	0.613	2,66	3,54	0,068
	Macaubal	0,49	0,55	0.332	2,23	3,38	0,113
	S. A. Aracanguá	0,49	0,51	0.961	2,24	3,36	0,039
	Planalto	0,52	0,52	0.658	2,23	3,38	-0,005
	Sales	0,29	0,36	0.062	1,79	2,50	0,197
	Novo Horizonte	0,34	0,37	0.289	1,79	2,72	0,095
<i>H. raniceps</i>	Votuporanga	0,56	0,57	0.864	3,48	4,52	0,030
	Macaubal	0,57	0,60	0.536	3,46	4,09	0,034
	S. A. Aracanguá	0,54	0,59	0.101	3,86	4,53	0,085
	Planalto	0,50	0,52	0.740	2,87	3,89	0,032
	Sales	0,34	0,37	0.392	2,49	3,18	0,093
	Novo Horizonte	0,36	0,39	0.481	1,87	2,30	0,070

Ho = heterozigosidade observada; He = heterozigosidade esperada; P_{HWE} = probabilidade de desvio (valor de p) do equilíbrio de Hardy-Weinberg; Ne = número efetivo de alelos; RA = riqueza alélica; F_{is} = coeficiente de endocruzamento intrapopulacional.

Os índices de diversidade genética para as duas espécies indicaram heterogeneidade entre as populações amostradas. Em ambas as espécies, as populações do Tietê Batalha (Sales e Novo Horizonte) exibiram uma depreciação em todos os índices de diversidade genética. A população de Sales em *L. chaquensis*, também exibiu um coeficiente de endocruzamento alto ($F_{is} = 0,197$), enquanto que as demais populações não apresentaram um valor significativo. A partir da visualização da diversidade reduzida em duas populações em ambas as espécies, os índices foram comparados entre os grupos do Baixo Tietê e Tietê Batalha no aplicativo FSTAT 2.9.3.2 (Goudet 1997), sendo detectadas diferenças significantes para heterozigosidade observada ($p = 0,05$ em *H. raniceps*; $p = 0,05$ em *L. chaquensis*), esperada ($p = 0,05$ em *H. raniceps*; $p = 0,02$ em *L. chaquensis*) e riqueza alélica ($p = 0,04$ em *H. raniceps*; $p = 0,05$ em *L. chaquensis*).

Organização da variação genética interpopulacional

As populações foram comparadas aos pares para detecção de dissimilaridades entre elas com base na análise de parâmetros variados. Os valores dos índices F_{st} e R_{st} de diferenciação genética interpopulacional foram correlacionados (Tabela 3) e, em *L. chaquensis* evidenciaram uma baixa a elevada estruturação genética entre as comparações das populações par a par. De forma geral, os maiores valores de diferenciação populacional foram observados nas comparações das populações do Tietê Batalha com as demais populações,

excetuando Votuporanga. Em *H. raniceps*, esse índice apresentou significância ($p < 0,05$) em todas as comparações, a exceção do par populacional Macaubal – Votuporanga, que foi evidenciado uma baixa estruturação (0,028). Além disso, foram observados valores de alta estruturação ($> 0,15$) em praticamente todas as comparações par a par nas populações do Tietê Batalha com outras populações.

Tabela 3: Índices F_{st} e R_{st} (entre parênteses) entre as populações das duas espécies.

Espécies / Populações		Votutoranga	Macaubal	S. A. Aracanguá	Planalto	Sales
<i>L. chaquensis</i>						
Macaubal		0,015 (0,015)				
S. A. Aracanguá		0,049* (0,052)	0,023 (0,024)			
Planalto		0,036* (0,037)	0,056* (0,059)	0,049* (0,052)		
Sales		0,088* (0,096)	0,145* (0,169)	0,196* (0,243)	0,137* (0,159)	
Novo Horizonte		0,059* (0,063)	0,099* (0,110)	0,183* (0,224)	0,085* (0,093)	0,053* (0,056)
<i>H. raniceps</i>						
Macaubal		0,028 (0,029)				
S. A. Aracanguá		0,060* (0,064)	0,062* (0,066)			
Planalto		0,055* (0,058)	0,050* (0,053)	0,051* (0,054)		
Sales		0,207* (0,260)	0,181* (0,222)	0,173* (0,209)	0,136* (0,158)	
Novo Horizonte		0,258* (0,347)	0,250* (0,334)	0,227* (0,294)	0,192* (0,237)	0,120* (0,136)

* = Valores de p significantes.

A espécie *L. chaquensis* exibiu 6,18% de alelos privados na média das populações, distribuídos nas populações de Planalto (15,79%), Macaubal (10,53%), Votuporanga (4,88%), Novo Horizonte (3,23%) e S. A. Aracanguá (2,63%), a exceção da população de Sales que não exibiu alelo privado. Em *H. raniceps*, o número médio de alelos privados foi mais pronunciado na média das seis populações (6,8%), com as maiores quantidades detectadas nas populações de Votuporanga (17,65%), Sales (8,33%), Macaubal (6,52%), Santo Antônio do Aracanguá (6%) e Planalto (2,33%), respectivamente, enquanto que na população de Novo Horizonte não foi detectada a presença de alelos privados.

O cálculo do número médio de migrantes por geração para as espécies (Tabela 4) evidenciou um maior fluxo gênico entre as populações de *L. chaquensis* ($N_m = 2,27$ populações agrupadas), enquanto que *H. raniceps*, o valor de N_m foi de 1,155. Contudo, as duas espécies apresentam similaridade nos menores índices de fluxo gênico ($N_m < 1$), que foram visualizados nas comparações par a par das populações do Baixo Tietê com as demais populações (inclusive entre Sales e Novo Horizonte).

Tabela 4: Estimativa do número médio de migrantes (Nm) entre as populações.

Espécies / Populações					
	Votutoranga	Macaubal	S. A. Aracanguá	Planalto	Sales
<i>L. chaquensis</i>					
Macaubal	1,336				
S. A. Aracanguá	0,918	1,849			
Planalto	1,078	1,095	1,505		
Sales	0,625	0,576	0,835	0,691	
Novo Horizonte	0,965	1,256	0,569	0,980	0,759
<i>H. raniceps</i>					
Macaubal	1,343				
S. A. Aracanguá	1,000	1,364			
Planalto	1,219	1,326	1,225		
Sales	0,813	0,599	0,669	0,833	
Novo Horizonte	0,559	0,327	0,526	0,515	0,447

A análise bayesiana pelo STRUCTURE 2.3.1 forneceu as probabilidades de agrupamentos populacionais para as espécies. As curvas de probabilidades obtidas para as duas espécies foram similares onde alguns indivíduos são fortemente destinados a um grupo (k) ou outro, indicando estruturação populacional (Figura 2). Utilizando o modelo de frequências alélicas independentes, o aplicativo sugere a presença de dois grupos (Gráfico 1) para as duas espécies ($k = 1$ Ln = -1666; $k = 2$ Ln = -1552; $k = 3$ Ln = -1547; $k = 4$ Ln = -1536; $k = 5$ Ln = -1547 para *H. raniceps*; $k = 1$ Ln = -1350; $k = 2$ Ln = -1316; $k = 3$ Ln = -1301; $k = 4$ Ln = -1304; $k = 5$ Ln = -1297 para *L. chaquensis*), onde o primeiro grupo é constituído basicamente das populações do Baixo Tietê (Votuporanga, Macaubal, Santo Antônio do Aracanguá e Planalto), com alguns indivíduos miscigenados (especialmente indivíduos da população de Planalto em *H. raniceps* e de Votuporanga e Macaubal em *L. chaquensis*) com o segundo grupo, que é composto pelas duas populações do Tietê Batalha com poucos indivíduos miscigenados. Quando empregado o modelo de frequências correlacionadas de alelos, o agrupamento mais provável foi também composto por duas populações nas duas espécies (Gráfico 1), fornecendo fortes evidências da estruturação genética entre as populações do Tietê Batalha e do Baixo Tietê (Figura 2).

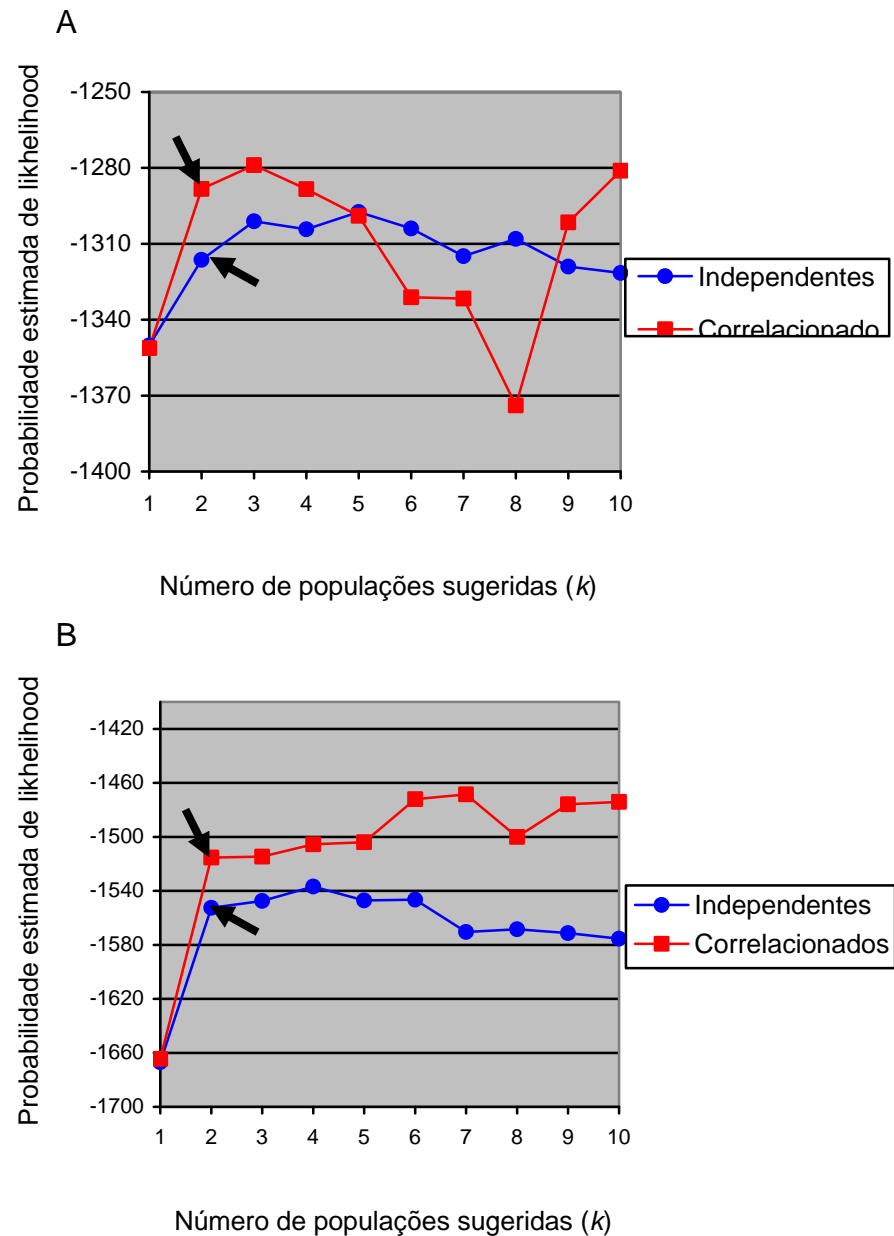


Gráfico 1: Curva de probabilidade produzida pelo Structure 2.3.1 fornecendo o número provável de agrupamentos populacionais em *L. chaquensis* (A) e *H. raniceps* (B) pelo modelo de ancestralidade compartilhada com frequência de alelos correlacionados e independentes. Setas indicam o número mais provável ($k = 2$ em todos os casos).

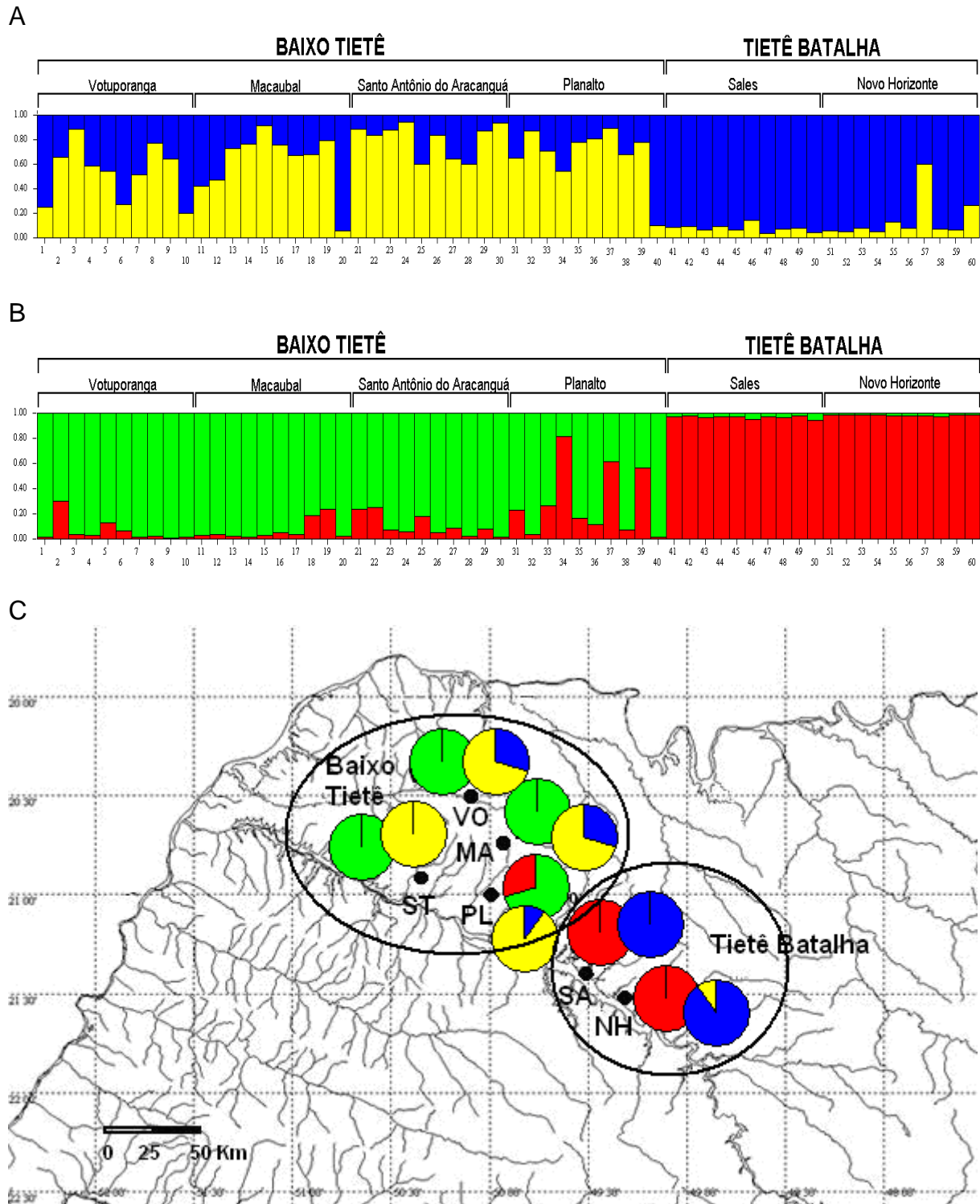


Figura 2: Agrupamentos definidos pelo STRUCTURE 2.3.1, onde cada indivíduo é representado por uma única linha vertical e as cores representam a quantidade de grupos (k) inferidos. O comprimento das cores dentro de cada coluna é proporcional à probabilidade do indivíduo de pertencer ao grupo. *L. chaquensis* (A) e *H. raniceps* (B) inferidos com 2 grupos com modelo independente; C = Distribuição geográfica dos grupos; MA = população de Macaúbal; NH = Novo Horizonte; PL = Planalto; SA = Sales; ST = Santo Antônio do Aracanguá; VO = Votuporanga.

A análise do particionamento da variância molecular “AMOVA” entre os grupos definidos pelo STRUCTURE (populações do Baixo Tietê x populações do Tietê Batalha) para as duas espécies, detectou diferenças altamente significativas nos níveis de variação entre os grupos em *L. chaquensis* (7,83% variação entre os grupos; $F_{ct} = 0,0731$; $p = 0,0000$) e em *H. raniceps* (13,34% variação entre os grupos; $F_{ct} = 0,13339$; $p = 0,0000$).

HISTÓRICO DEMOGRÁFICO

Os resultados do teste Mantel baseado no índice R_{st} detectaram isolamento por distância nas duas espécies. Em *H. raniceps*, o teste apresentou elevada comprovação estatística ($r_{mantel} = 0,835282$; $p = 0,001$), enquanto que em *L. chaquensis* o isolamento por distância foi também significativo ($r_{mantel} = 0,662162$; $p = 0,023$).

Os resultados do teste Wilcoxon sign-rank não evidenciaram declínios populacionais recentes (Tabela 5), a exceção de uma população proveniente do Tietê Batalha (Novo Horizonte) de *H. raniceps*, em que foi detectado valor significativo ($p = 0,03906$) para eventos de gargalo de garrafa empregando o modelo *two-phase model* (com 70% de *stepwise mutation model*).

Tabela 5: Resultados do teste Wilcoxon sign-rank rank unicaudal (valores de p) gerados pelo programa BOTTLENECK 1.2.0.02 com 10.000 réplicas com os modelos S.M.M. e T.P.M. 70% e 90% de S.M.M.

Espécies	Populações	Modelos evolutivos		
		S.M.M.	T.P.M. (70%)	T.P.M. (90%)
<i>L. chaquensis</i>	Votuporanga	0,41553	0,10303	0,23242
	Macaubal	0,83984	0,48291	0,64990
	S. A. Aracanguá	0,71143	0,48291	0,55078
	Planalto	0,89697	0,61768	0,79346
	Sales	0,78711	0,58984	0,67383
	Novo Horizonte	0,99023	0,93555	0,97559
<i>H. raniceps</i>	Votuporanga	0,86230	0,57715	0,81250
	Macaubal	0,28516	0,17969	0,28516
	S. A. Aracanguá	0,28516	0,10156	0,10156
	Planalto	0,91992	0,83887	0,88379
	Sales	0,98047	0,76953	0,87500
	Novo Horizonte	0,18750	0,03906	0,18750

S.M.M. = *stepwise mutation model*; T.P.M. = *two-phase model*.

Discussão

A viabilidade das espécies é dependente da persistência local das populações e, a fragmentação ambiental aumenta o risco de extinção local causada pela perda da diversidade genética (Di Battista 2007) e, aumento da endogamia e processos estocásticos demográficos (Frankham 1995), isolando populações e promovendo uma redução do fluxo de genes (Frahnkhan *et al.* 2002; Toro e Caballero 2005) e no tamanho populacional (Young *et al.* 1996).

Os anfíbios são particularmente propensos a sofrer diretamente com a alteração das paisagens, por causa de sua estrutura de metapopulação e da baixa capacidade de dispersão (Laan e Verboon 1990; Miaud 1990, Joly *et al.* 2001; Ficetola e De Bernardi 2004). Logo, a conectividade dos habitats parece desempenhar um papel fundamental na viabilidade regional das populações de anfíbios (Rothermel e Semlitsch 2002), com evidências claras sobre os efeitos depressivos da fragmentação dos habitats na dispersão dos anfíbios juvenis, convertendo-se como uma das questões primordiais para a conservação dos anfíbios (Vos e Chardon 1998). Contudo, Marsh e Trenham (2001) e Smith e Green (2005), sugerem cautela na aplicação de padrões de locomoção dos anfíbios, pois existe uma larga escala de habilidade de dispersão dentro das espécies do grupo, e esses cuidados devem ser tomados especialmente onde às decisões de conservação devem ser baseadas nas suposições de isolamento e dispersão das populações.

O declínio nos índices de diversidade genética nas populações do Tietê Batalha, a elevada diferenciação genética em relação às populações do Baixo Tietê, bem como, os altos valores de coeficiente de endogamia e evidências de declínio populacional detectados em algumas populações do Tietê Batalha, sugerem uma capacidade de dispersão limitada nas populações inseridas no Tietê Batalha, mediadas pelo tipo de matriz predominante na área (monocultura densa). Essas diferenças genéticas foram principalmente devidas a mudanças nas frequências dos alelos, visto que as populações são desprovidas de alelos privados em quantidade significativa.

A região do Tietê Batalha é considerada predominantemente de agropecuária, sofrendo desmatamento intenso e descontrolado. Comparando-se os índices de vegetação nativa com as demais regiões, constata-se que a região apresenta um percentual de 6,24%, bem inferior aos valores de todo o Estado de São Paulo

(13,7%). O desmatamento se deu de forma intensa a partir da década de 1930, com a instalação de fazendas cafeeiras. Com o declínio dessa atividade ocorreu a mudança de uso do solo para as atividades agropecuárias, com a implantação do cultivo de cana-de-açúcar (CETEC 2008). Segundo Rudorff *et al.* (2004), 37% da região que inclui os municípios de Sales e Novo Horizonte, é destinada a cultura de cana-de-açúcar, enquanto que os municípios de Votuporanga, Macaúbal, Santo Antônio do Aracanguá e Planalto estão inseridos em regiões onde a porcentagem destinada a esse tipo de prática intensiva não ultrapassa os 9%.

Em estudo conduzido com marcadores microssatélites por Arruda *et al.* (2010d), nos mesmos locais de coleta do atual estudo, os autores não visualizaram redução na diversidade genética neutra ou estruturação populacional na espécie *R. schneideri*, mesmo nas populações inseridas no Tietê Batalha. Isso pode ser relacionado à baixa vagilidade das espécies do estudo atual (isolamento por distância em ambas as espécies e com menor Nm em relação a *R. schneideri*) na comparação com *R. schneideri* (Nm = 3,58 nas populações agrupadas e sem isolamento por distância), bem como a diferenças relacionadas à percepção espécie-específica da viscosidade dos fragmentos e da permeabilidade de borda dos campos agrícolas adjacentes (Wiens 1997). Isso nos conduz a um modelo em que espécies com baixa vagilidade (como detectado nesse estudo) e percepção são notadamente mais prejudicadas por monoculturas agrícolas densas (e.g. cana-de-açúcar), que são menos permeáveis, funcionando como um filtro seletivo, reduzindo a dispersão e conectividade do hábitat.

Garner *et al.* (2003), em estudo conduzido na espécie *Rana latestei* com DNA microssatélite, identificaram nas populações suíças um nível menor de riqueza alélica ($p = 0,011$; próximas até 60 Km) em relação às populações italianas, sem no entanto encontrar evidência de diferenças entre a heterozigosidade média ($p = 0,135$). Noël *et al.* (2007), empregando marcadores microssatélites em populações urbanas e rurais da salamandra *Plethodon cinereus*, verificou uma diversidade significativamente menor na população urbana (riqueza alélica $p = 0,008$), com uma evidente estruturação entre as populações urbanas, mesmo separadas por distâncias pequenas (0.9 a 3.3 km). Outros trabalhos, com uma variedade de espécies de anfíbios identificaram diversidade genética reduzida e forte estruturação em populações de habitats fragmentados (Andersen *et al.* 2004; Arruda e Morielle-Versute, 2008). Independente da escala geográfica, o baixo nível de diversidade

genética tem sido demonstrado afetar negativamente a aptidão dos anuros em sapos (*Bufo bufo*, Hitchings e Beebee, 1998; *Bufo calamita*, Rowe *et al.* 1999), rãs (*Rana temporaria*, Hitchings e Beebee 1997) e pererecas (*Hyla cinerea*, McAlpine 1993).

Johansson *et al.* (2005), avaliando geneticamente populações de *Rana temporaria* provenientes de áreas com paisagens agrícolas diferentes, encontraram nas populações ao sul da Suécia uma diversidade reduzida conforme o aumento da atividade agrícola, e um padrão oposto no norte. Os autores concluem que as perturbações humanas não são necessariamente desvantajosas, mas que efeitos opostos são possíveis, dependendo do contexto ecológico considerado, como no caso das perturbações da região norte que são bastante diferentes das observadas no sul. De acordo com Johansson *et al.* (2007), a agricultura, induzindo a fragmentação do hábitat, pode aumentar o papel da deriva genética e, por extensão, reduzir a variabilidade de marcadores genéticos neutros e a média de valores de características relacionadas à aptidão.

Em nosso estudo, as evidências de empobrecimento genético nas populações do Tietê Batalha podem estar relacionadas à diminuição do tamanho populacional combinada com aumento da endogamia induzidos pela fragmentação ambiental (redução da dispersão) e subsequente deriva genética. Essa hipótese é refletida no elevado grau de diferenciação genética (F_{st} , R_{st} , análise bayesiana e AMOVA), que resultou em valores médios de N_m consideravelmente inferiores a 1 nas populações do Tietê Batalha comparadas com as demais (e entre elas), valor no qual as mudanças das frequências dos alelos são mediadas provavelmente por deriva (Slatkin 1985).

A capacidade de dispersão dos organismos, em última análise, determina o isolamento funcional dos fragmentos (Trakhtenbrot *et al.* 2005). Na região do Baixo Tietê, que inclui as demais áreas analisadas nesse estudo, o índice de cobertura vegetal nativa é ainda inferior à região do Tietê Batalha (3% vs. 6,24%), mas com impacto antrópico formado especialmente por grandes áreas de pecuária de pastos sem sombra (83% - CETEC 2000). Esse tipo de matriz pode ser um ambiente hostil aos anfíbios, porque os animais ectotérmicos sofrem dessecação e riscos de predação (Rothermel e Semlitsch 2002), entretanto, elas parecem ser mais adequadas à dispersão dessas espécies do que o cultivo de monoculturas intensivas (e.g. cana-de-açúcar).

DiBattista (2007), em estudo de meta análise, encontrou uma associação consistente entre os distúrbios humanos e as mudanças na variação genética neutra. De acordo com o autor, a direção dessas mudanças foi dependente do tipo de perturbação humana experimentada, com alguns distúrbios que consistentemente diminuíram a variação genética (e.g. assentamentos humanos / auto-estradas), enquanto outros não tiveram efeito (e.g. caça / culturas agrícolas). Contudo, a partir de nossos resultados, é possível concluir que as práticas agrícolas têm efeito direto na redução da diversidade genética em anfíbios, quando essas culturas fornecem barreiras geográficas para a dispersão (redução da dispersão mais provável em espécies com baixa vagilidade) e, dessa forma, promovendo uma fragmentação do hábitat a nível espécie-específico.

Implicações conservacionistas

Os anfíbios apresentam uma grande variedade de exigências de hábitat e capacidades de dispersão (Smith e Green 2005) e, a compreensão dos fatores que influenciam a dispersão é ainda bastante rudimentar (Rothermel e Semlitsch 2002; Rothermel 2004). Nesse artigo apontamos para um dos possíveis fatores envolvidos na redução da dispersão dos anuros, porém é necessária a elaboração de novos estudos que possam determinar outros fatores e melhor avaliar o impacto de diferentes culturas agrícolas para as espécies de anfíbios.

As duas espécies analisadas nesse estudo estão incluídas na categoria “pouco preocupante” na lista vermelha da IUCN, devido a suas amplas distribuições e presumível grande população, sendo improvável que experimentem um declínio acentuado. Contudo, muitas áreas de uso conveniente têm sido perdidas e populações ameaçadas devido a atividades humanas gerais como agricultura, fogo, perseguição para consumo e desenvolvimento de infra-estrutura (Maneyro e Langone 2001; Heyer *et al.* 2004; La Marca *et al.*, 2004).

As principais medidas mitigadoras devem ser focadas na região do Tietê Batalha a fim de recuperar a depleção nos índices de diversidade genética. A paisagem agrícola encontrada na região do Tietê Batalha (37% de cobertura por cana-de-açúcar) deve estar contribuindo para o declínio da dispersão entre as populações. Combinado com o tamanho reduzido populacional, devido à deteriorização da qualidade do hábitat, as populações de anfíbios podem sofrer redução nos níveis de diversidade genética e, subsequentemente aumento da

depressão endogâmica, devido à alta probabilidade de fixação de mutações deletérias (Frankham 1995).

Os resultados aqui reportados não indicam momentaneamente um alto nível de endogamia (a exceção da população de Sales de *L. chaquensis*) nas populações com depauperamento genético, mas essa última estimativa é preocupante visto estar correlacionada à aptidão e tamanho populacional (Reed e Frankham 2003). O aumento da desconexão nessas populações pode comprometer a sustentabilidade dessas espécies nesses locais, ocasionando extinções populacionais.

Os planos de conservação para essas espécies devem considerar as populações do Tietê Batalha como unidades de manejo com fluxo gênico restrito e, portanto, sujeitas a planos prioritários. A persistência dessas espécies parece ser dependente da conectividade entre os fragmentos e/ou lagoas de reprodução, que por sua vez impede o isolamento das populações. Possivelmente essas populações do Tietê Batalha eram contínuas com as do Baixo Tietê nas décadas passadas. O contato deve ser restaurado melhorando a permeabilidade do hábitat e permitindo uma renderização das populações isoladas. Aparentemente as duas espécies conseguem romper matrizes antrópicas abertas (pouco densas). Logo, para as populações do Tietê Batalha, a redução do cultivo de práticas agrícolas de monoculturas densas (e.g. cana-de-açúcar) e, a criação de corredores ecológicos livres dessas práticas agrícolas, que reconectem as lagoas de reprodução, são medidas que podem melhorar a qualidade do entorno e, conseqüentemente significar um prelúdio para a recuperação dos níveis de diversidade genética nessas populações.

Apontamos a necessidade de monitoramentos de longo prazo (> 5 anos) durante a temporada reprodutiva das populações do Tietê Batalha e, análises genéticas futuras para avaliar o impacto das medidas mitigatórias na restauração da diversidade genética dessas populações.

Em especial, as políticas brasileiras de conservação incluem instrumentos legais importantes como uma lista oficial de espécies ameaçadas e a seleção de áreas prioritárias para a conservação dos principais biomas (Silvano e Segala 2005). Embora a proteção de espécies no interior dos biomas seja a maior questão da biologia da conservação, as estratégias propostas serão incompletas e insustentáveis se desconsideradas as interconecções dos hábitats e das populações mantendo o maior número de interações biológicas dentro e fora dos fragmentos.

Ademais, os anfíbios considerados como indicadores de ambientes alterados, fornecem um alerta precoce para os problemas ambientais, servindo como modelo para compreensão da crise global da biodiversidade.

Agradecimentos

Estamos gratos a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro. CNPq apoiou também com subsídios 152757/2007-4 o autor Evonnildo Costa Gonçalves. Somos gratos a Silvanira Barbosa e Maria do Socorro, pelo apoio no laboratório.

Referências

- Alford RA, Dixon PM, Pechmann JHK (2001) Global amphibian population declines. *Nature*, **412**, 499–500.
- Andersen LW, Fog K, Damgaard C (2004) Habitat fragmentation causes bottlenecks and inbreeding in the European tree frog (*Hyla arborea*). *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **271**, 1293–1302.
- Arruda MP; Morielle-Versute E (2008) Cytogenetic and random amplified polymorphic DNA analysis of *Leptodactylus* species from rural and urban environments (Anura, Amphibia). *Genetics and Molecular Resources*, **7(1)**, 161-176.
- Arruda MP, Gonçalves EC, Silva ALC, Schneider MPC, Morielle-versute E (2010a). Development of eleven polymorphic microsatellite markers for the Chaco Treefrog, *Hypsiboas raniceps*. *Conservation Genetics Resources*, doi: 10.1007/s12686-010-9172-y
- Arruda MP, Morielle-Versute E, Silva ALC, Schneider MPC, Gonçalves EC (2010b). Twelve polymorphic microsatellite loci developed and optimized from the *Leptodactylus chaquensis*. *Molecular Ecology Resources*, **x**, x-x (A SER SUBMETIDO).
- Arruda MP, Gonçalves EC, Schneider MPC, Silva ALC, Morielle-Versute E (2010c) An alternative genotyping method using dye-labeled universal primer to reduce unspecific amplifications. *Molecular Biology Reports*, **37**, 2031-2036.
- Arruda MP, Gonçalves EC, Silva ALC, Schneider MPC, Morielle-versute E (2010d). Assessment of genetic diversity of generalist frog *Rhinella schneideri* in habitats

- with agricultural disturbance. *Biodiversity and Conservation*, **x**, x-x (A SER SUBMETIDO).
- Australia and New Zealand Council for the Care of Animals in Research and Teaching “ANZCCART” (2001) *Euthanasia of Animals Used for Scientific Purposes*. 2th ed. Australia and New Zealand: Reilly JS (Eds.)
- Barton NH, Slatkin M (1986) A quasi-equilibrium theory of the distribution of rare alleles in a subdivided population. *Heredity*, **56**, 409-415.
- Beebee TJC, Rowe G (2000) Microsatellite analysis of natterjack toad *Bufo calamita* *Laurenti* populations: consequences of dispersal from a *Pleistocene refugium*. *Biological Journal of the Linnean Society*, **69**, 367–381.
- Bohonak AJ (2002) IBD (isolation by distance): a program for analyses of isolation by distance. *Journal of Heredity*, **93**, 154–155.
- CETEC (2008) *Relatório de situação dos recursos hídricos da bacia hidrográfica do Tietê-Batalha*. São Paulo, 23p.
- CETEC (2000) *Relatório de situação dos recursos hídricos da bacia hidrográfica do Baixo Tietê*. São Paulo, 338p.
- Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, **144**, 2001–2014.
- DiBattista JD (2007) Patterns of genetic variation in anthropogenically impacted populations. *Conservation Genetics*. DOI 10.1007/s10592-007-9317-z
- Duellman WE (1999) Distribution patterns of amphibians in South America; 255-328 *In* WE Duellman (ed.). *Patterns of distribution of amphibians: A global perspective*. Baltimore and London: The Hopkins University Press
- Edman M, Gustafsson M, Stenlid J, Ericson L (2004) Abundance and viability of fungal spores along a forestry gradient – responses to habitat loss and isolation? *Oikos*, **104**, 35–42.
- Excoffier IG, Schneider S (2006) Arlequin 3.1: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, **1**, 47-50.
- Ficetola GF, De Bernardi F (2004) Amphibians in a human-dominated landscape: the community structure is related to habitat features and isolation. *Biological Conservation*, **119**, 219–230.
- Frankham R (1995) Conservation genetics. *Annual Review of Genetics*, **29**, 305–327.

- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press, Cambridge
- Frankham R (2005) Genetics and extinction. *Biological Conservation*, 126, 131–140.
- Fundação SOS Mata Atlântica (2002) Atlas da Mata Atlântica. <<http://www.sosmataatlantica.org.br/>>. Downloaded on 01 Dezembro 2009.
- Galeuchet DJ, Perret C, Fischer M (2005) Performance of *Lychnis flos-cuculi* from fragmented populations under experimental biotic interactions. *Ecology*, **86**, 1002–1011.
- Garner TWJ, Angelone S, Pearman PB (2003) Genetic depletion in Swiss population of *Rana latastei*: conservation implications. *Biological Conservation*, **114**, 371–376.
- Gibbs JP (1998) Distribution of woodland amphibians along a forest fragmentation gradient. *Landscape Ecology*, **13**, 263–268.
- Gordo M, Campos ZMS (2005) *Anuros das serras de entorno do Pantanal Sul*. Séries Documentos / Embrapa Pantanal ISSN 1517-1973; 78.
- Goudet J (1997) *FSTAT: A Program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices*. 2.8. Switzerland: Université de Lausanne
- Gray MJ, Smith LM, Brenes R (2004) Effects of agricultural cultivation on demographics of southern high plains amphibians. *Conservation Biology*, **18**(5), 1368–1377.
- Guo SW, Thompson EA (1992) Performing the exact test of Hardy–Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, **48**, 361–372.
- Hartl DL, Clark AG (1989) *Principles of population genetics*. 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Hecnar SJ, M'Closkey T (1997) Patterns of nestedness and species association in a pond-dwelling amphibian fauna. *Oikos*, **80**, 371–381.
- Heyer R, Reichle S, Silvano D, Lavilla E, Tada I (2004). *Leptodactylus chaquensis*. In: IUCN 2009. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2009.1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on **07 October 2009**.
- Hitchings SP, Beebee TJC (1997) Genetic substructuring as a result of barriers to gene flow in urban *Rana temporaria* (common frog) populations: implications for biodiversity conservation. *Heredity*, **79**, 117–121.

- Hitchings SP, Beebee TJC (1998) Loss of genetic diversity and fitness in common toad (*Bufo bufo*) populations isolated by inimical habitat. *Journal of Evolutionary Biology*, **11**, 269–283.
- IPT, Instituto de Pesquisas Tecnológicas do estado de São Paulo (2000) *Diagnóstico da situação atual dos recursos hídricos e estabelecimento de diretrizes técnicas para a elaboração do plano da Bacia São José dos Dourados* – Relatório nº 40675 – Minuta. CD Room.
- Johansson M, Primmer CR, Sahlsten J, Merilä J (2005) The influence of landscape structure on occurrence, abundance and genetic diversity of the common frog, *Rana temporaria*. *Global Change Biology*, **11**, 1664–1679.
- Johansson M, Primmer CR, Merilä J. (2007) Does habitat fragmentation reduce fitness and adaptability? A case study of the common frog (*Rana temporaria*). *Molecular Ecology*, **16**, 2693–2700.
- Joly P, Miaud C, Lehmann A, Grolet O (2001) Habitat matrix effects on pond occupancy in newts. *Conservation Biology*, **15**, 239–248.
- Klink CA, Machado RB (2005) Conservation of the Brazilian cerrado. *Conservation Biology*, **19**, 707–713.
- Knutson MG, Sauer JR, Olsen DA, Mossman MJ, Hemesath LM, Lannoo MJ (1999) Effects of landscape composition and wetland fragmentation on frog and toad abundance and species richness in Iowa and Wisconsin, U.S.A. *Conservation Biology*, **13**(6), 1437–1446.
- Kolozsvary MB, Swihart RK (1999) Habitat fragmentation and the distribution of amphibians: patch and landscape correlates in farmland. *Canadian Journal of Zoology*, **77**, 1288–1299.
- Laan R, Verboom B (1990) Effects of pool size and isolation on amphibian communities. *Biological Conservation*, **54**, 251–262.
- La Marca E, Azevedo-Ramos C, Silvano D, Scott N, Aquino L, Faivovich J (2004). *Hypsiboas raniceps*. In: IUCN 2009. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2009.1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 05 October 2009
- Laurance WF, Lovejoy TE, Vasconcelos HL, Bruna EM, Didham RK, Stouffer PC, Gascon C, Bierregaard RO, Laurance SG, Sampaio E (2002) Ecosystem decay of Amazonian forest fragments: a 22-year investigation. *Conservation Biology*, **16**, 605–618.

- Levene H (1949) On a matching problem in genetics. *Annals of Mathematical Statistics*, **20**, 91-94.
- McAlpine S (1993) Genetic heterozygosity and reproductive success in the green treefrog, *Hyla cinerea*. *Heredity*, **70**, 553-558.
- Maneyro R, Langone JA (2001) Categorización de los anfibios del Uruguay. *Cuadernos de Herpetología*, **15(2)**, 107-118.
- Marsh DM, Trenham PC (2001) Metapopulation dynamics and amphibian conservation. *Conservation Biology*, **15**, 40-49.
- Miaud C (1990) *La dynamique des populations subdivisées: étude comparative chez trois amphibiens urodèles (Triturus alpestris, T. helveticus et T. cristatus)*. PhD thesis, Claude Bernard Lyon I University, Villeurbanne.
- Newman RA, Squire T (2001) Microsatellite variation and finescale population structure in the wood frog (*Rana sylvatica*). *Molecular Ecology*, **10**, 1087-1100.
- Noël S, Ouellet M, Galois P, Lapointe FJ (2007) Impact of urban fragmentation on the genetic structure of the eastern red-backed salamander. *Conservation Genetics*, **8**, 599-606.
- Oldham RS, Keeble J, Swan MJS, Jeffcote M (2000) Evaluating the suitability of habitat for the great crested newt (*Triturus cristatus*). *The Herpetological Journal*, **10**, 143-155.
- Piry S, Luikart GE, Cornuet JM (1999) BOTTLENECK: a computer program for detecting reductions in the effective size using allele frequency. *Journal of Heredity*, **90**, 502-503.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**, 945-959.
- PROBIO (1998) *Áreas de domínio do cerrado no Estado de São Paulo*. Imprensa Oficial, Secretaria do Meio Ambiente de São Paulo, São Paulo.
- Reed DH, Frankham R (2003) Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology*, **17**, 230-237.
- Reh W, Seitz A (1990) The influence of land use on the genetic structure of populations of the common frog *Rana temporaria*. *Biological Conservation*, **54**, 239-249.
- Roberge JM, Angelstam P (2004) Usefulness of the umbrella species concept as a conservation tool. *Conservation Biology*, **18**, 76-85.

- Rothermel BB, Semlitsch RD (2002) An experimental investigation of landscape resistance of forest versus old-field habitats to emigrating juvenile amphibians. *Conservation Biology*, **16**, 1324-1332.
- Rothermel BB (2004) Migratory success of juveniles: a potential constraint on connectivity for pond-breeding amphibians. *Ecological Applications*, **14(5)**, 1535–1546.
- Rousset F (2008) GENEPOP'007: a complete re-implementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, **8**, 103-106.
- Rowe G (1999) Microsatellite heterozygosity, fitness, and demography in natterjack toads *Bufo calamita*. *Animal Conservation*, **2**, 85–92.
- Rudorff BFT, Berka LMS, Xavier AC, Moreira MA, Duarte V, Rosa VGC, Shimabukuro YE (2004) *Estimativa de área plantada com cana-de-açúcar em municípios do estado de São Paulo por meio de imagens de satélites e técnicas de geoprocessamento: ano safra 2003/2004*. São José dos Campos: Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, 47 p. (INPE-10791-RPQ/759).
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning - a laboratory manual*. 2th ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Saunders DA, Hobbs RJ, Margules CR (1991) Biological consequences of ecosystem fragmentation: a review. *Conservation Biology*, **5**, 18–30.
- Schlötterer C (2000) Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, **109**, 365–371.
- Semlitsch RD (2000) Principles for management of aquatic-breeding amphibians. *Journal of Wildlife Management*, **64**, 615-631.
- Silvano DL, Segalla MV (2005) Conservation of brazilian amphibians. *Conservation Biology*, **19(3)**, 653-658.
- Slatkin M (1985) Rare alleles of indicators of gene flow. *Evolution*, **39**, 53-65.
- Slatkin M (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, **139**, 457-462.
- SMA/IF (Secretaria do Meio Ambiente / Instituto Florestal) (2005) *Inventário florestal da vegetação natural do Estado de São Paulo*. Imprensa Oficial do Estado de São Paulo, São Paulo.
- Smith LM, Gray MJ, Quales A (2004) Diets of newly metamorphosed amphibians in west Texas playas. *Southwestern Naturalist*, **49**, 257-263.

- Smith MA, Green DM (2005) Dispersal and the metapopulation paradigm in amphibian ecology e conservation: are all amphibian populations metapopulations? *Ecography*, **28**, 693-695.
- Stuart SN, Chanson JS, Cox NA, Young BE, Rodrigues ASL, Fischman DL, Waller DW (2004) Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*, **306**, 1783–1786.
- Toro MA, Caballero A (2005) Characterization and conservation of genetic diversity in subdivided populations. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, **360**, 1367–1378.
- Trakhtenbrot A, Nathan R, Perry G, Richardson DM (2005) The importance of long-distance dispersal in biodiversity conservation. *Diversity and Distributions*, **11**, 173–181.
- Turner IM (1996) Species loss in fragments of tropical rain forest: a review of the evidence. *Journal of Applied Ecology*, **33**, 200–209.
- Uetanabaro M, Prado CPA, Rodrigues DJ, Gordo M, Campos Z (2008) *Guia de Campo de Anuros do Pantanal Sul e Planaltos de Entorno*. Editora UFMS. Campo Grande.
- Vos CC, Chardon JP (1998) Effects of habitat fragmentation and road density on the distribution pattern of the moor frog *Rana arvalis*. *Journal of Applied Ecology*, **35**, 44–56.
- Waldman B, Tocher M (1998) Behavioral ecology, genetic diversity and declining amphibian populations. In: Caro TM. (Ed.) *Behavioral Ecology and Conservation Biology*. Oxford University Press, Oxford.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**, 1358-1370.
- Wiens JA (1997) Metapopulation dynamics and landscape ecology. Pages 43-68 In Hanski IA, Gilpin ME. editors. *Metapopulation biology: ecology, genetics, and evolution*. Academic, New York.
- Whiteley AR, Spruell P, Allendorf FW (2006) Can common species provide valuable information for conservation? *Molecular Ecology*, **35**, 2767-2786, 2006.
- Wright DH, Patterson BD, Mikkelsen GM, Cutler A, Atmar W (1998) A comparative analysis of nested subset patterns of species composition. *Oecologia*, **113**, 1-20.

- Yeh FC, Yang R, Boyle T (1997) *POPGENE Version 1.32: Software Microsoft Window-Based Freeware for Population Genetic Analysis*. University of Alberta, Alberta, Canada.
- Young A, Boyle T, Brown T (1996) The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *TREE*, **11**, 413–419.
- Young BE, Lips KR, Reaser JK, Ibanez R, Salas AW, Cedeno JR, Coloma LA, Ron S, La Marca E, Meyer JR, Munoz A, Bolanos F, Chaves G, Romo D (2000) Population declines and priorities for Amphibian conservation in Latin America. *Conservation Biology*, **15**, 1213–1223.

3 CAPÍTULO II: MÉTODO PARA ANÁLISE DE FRAGMENTOS

Artigo 3: ARRUDA et al. An alternative genotyping method using dye-labeled universal primer to reduce unspecific amplifications. **Molecular Biology Reports**, v. 37, p. 2031-2036, 2010 (PUBLICADO ON-LINE EM 30 DE JULHO DE 2009).

3.1 ARTIGO 3

Mol Biol Rep (2010) 37:2031–2036
DOI 10.1007/s11033-009-9655-7

An alternative genotyping method using dye-labeled universal primer to reduce unspecific amplifications

Maurício Papa de Arruda · Evonnildo Costa Gonçalves ·
Maria Paula Cruz Schneider · Artur Luiz da Costa da Silva ·
Eliana Morielle-Versute

Received: 28 April 2009 / Accepted: 21 July 2009 / Published online: 30 July 2009
© Springer Science+Business Media B.V. 2009

Abstract We proposed a modification the procedure of genotyping based in labeled universal primer and tailed primer. In the standard protocol, three primers are used in the same PCR reaction, a forward primer with tail added at the 5' end of the identical sequence to labeled universal primer with dye-fluorescent and a reverse primer. Unfortunately, the choice of a labeled primer characterized by a large number of complementary sequences in target genomes (which is more probable in larger genomes) result in unspecific amplifications (false positive) can cause absence or decrease amplification of the locus of interest and also false interpretation of the analysis. However, identification of possible homologies between the primer chosen for labelling and the genome is rarely possible from the available DNA data bases. In our approach, cycling is interrupted for the addition of the labeled primer only during the final cycles, thus minimizing unspecific amplification and competition between primers, resulting in the more fidelity amplification of the target regions.

Keywords Genotyping · Labeled primer · Microsatellites · Tailed primer · Unspecific amplifications · Laser detection systems

Introduction

A number of useful methods are available for the identification of alleles, although one of the most important is the laser detection system. The principal disadvantage of this system is to depend on the use of fluorescent dyes, generally carried in primers used for the amplification by Polymerase Chain Reaction (PCR). The elevated cost of this labelling often limits the development of projects based on the analysis of a large number of loci.

As a way of reducing the cost of genotyping research, Steffens [1] proposed a procedure based on the use of three primers where two primers (forward and reverse) are specific to the genome being studied (flanking the target region), whereas the third is unspecific and labeled with a fluorophore. The forward primer—known as the chimera—has a tail of nucleotides identical to the sequence of the labeled primer at its 5' end. The principle of this technique is based on the incorporation of the complementary sequence of the tail into the PCR products during the first few cycles, through the use of the annealing temperature (T_a) of the genome-specific oligonucleotides. During the final cycles, the T_a is adjusted to that of the labeled primer, which then hybridizes with the complementary region of the tail synthesized previously, resulting in the amplification of the target region. This method has provided the baseline for similar procedures proposed [2–4].

In general, the methods based on the use of labeled primers employ the universal M13 sequence (TGTAACAAC GACGGCCAGT) for conjugation to the fluorescent dye. While other sequences may be used, it is essential that the labeled primer does not present any significant homology with the DNA sequence of the genome being analyzed (which is more probable in larger genomes) [3]. Avoidance of this potential problem in the design of the primer

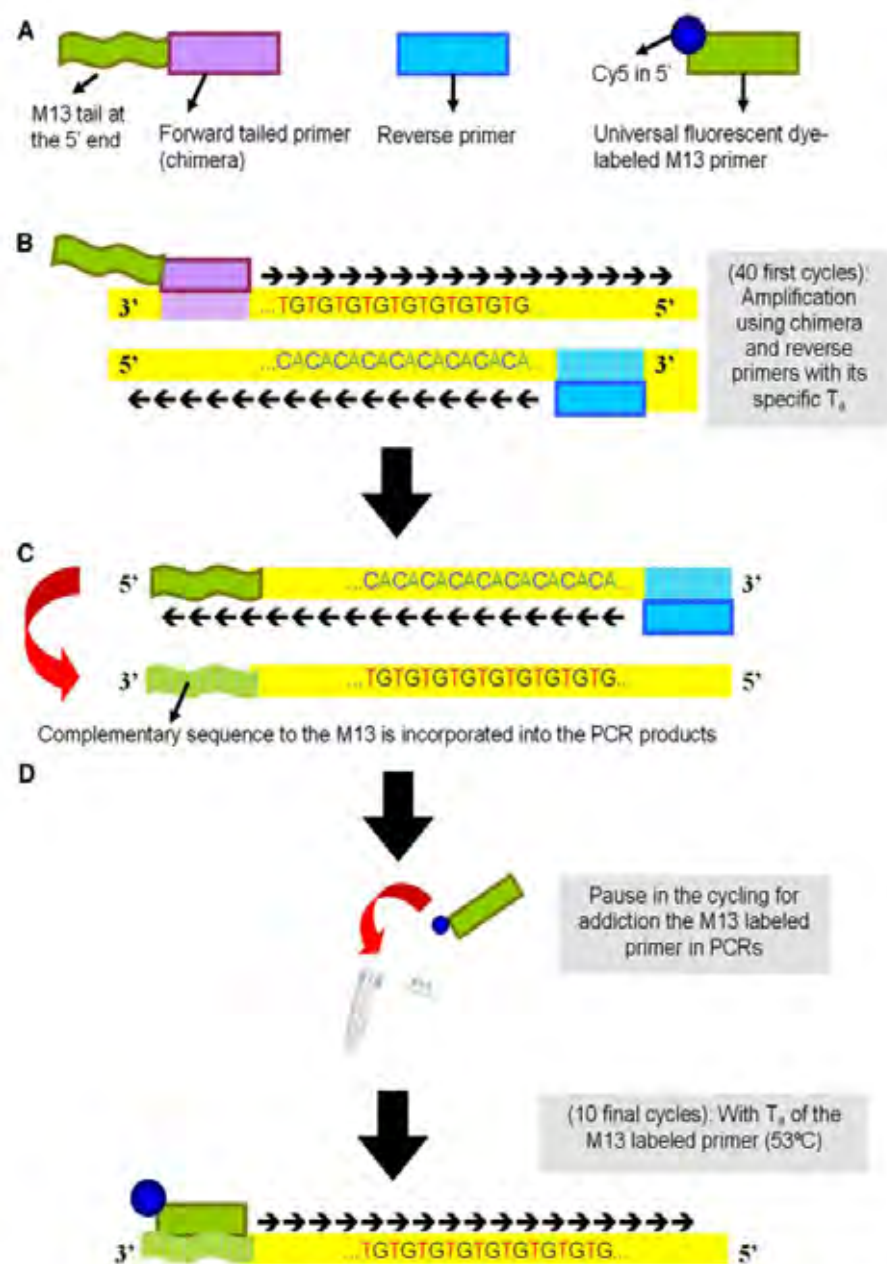
M. P. de Arruda (✉) · E. Morielle-Versute
Laboratório de Chiroptera/Departamento de Zoologia e
Botânica, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus S.J.
Rio Preto, São Paulo, Brazil
e-mail: arrudabio@gmail.com

E. C. Gonçalves · M. P. C. Schneider · A. L. da Costa da Silva
Laboratório de Polimorfismo de DNA/Instituto de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém, Brazil

minimizes the production of unspecific amplifications which can result in erroneous interpretations of the data. Despite the apparent advances in genotyping studies, the DNA data bases currently available do not provide even partial data on the genomes of the majority of organisms, which prohibits the identification of possible homologies between the primer chosen for labelling with the fluorescent dye and the target genome.

Given these limitations, to improve genotyping we have developed a strategy that reduces the unspecific amplifications. The procedure is based on the modification of the protocol described by Schuelke [4], where the fluorophore-conjugated primer is added to the PCR only in the final 10 cycles (Fig. 1). This ensures greater fidelity in the amplification of the target products (amplicons with complementary sequence of the tail incorporated).

Fig. 1 Representation of the protocol developed. **a** Three-primer system; **b** first cycles using only the chimera and reverse primers; **c** products obtained after a number of first cycles, following the incorporation and accumulation of the complementary region of the tail to the PCR product; **d** addition of the labeled primer and amplification of the target region +18 bp corresponding to the complementary region of the M13



Arruda M.P

Methods

Study species and DNA extraction

The experiments were conducted on the DNA of the amphibian species *Rhinella schneideri* (Bufonidae) and *Hypsiboas raniceps* (Hylidae). Sambrook et al. [5] protocol was used for the extraction of the DNA from muscle fragments obtained from the sixty specimens of each species. The purity and concentration of the sample DNA were estimated in a NanoDrop™ ND-1000 spectrophotometer.

Design and synthesis of the primers

Thirty-one pairs of primers were designed for the amplification of the microsatellite (SSR) sequences isolated from two species, using the Primer 3 program [6] and delineated according to Abd-Elsalam et al. [7]. For the labeled universal primer system, we chose the M13 universal sequence (TGTAACGACGCGCCAGT) as the non-specific primer for labelling with fluorophore. This sequence was also coupled to the 5' region of the forward primers (chimera). These tailed chimera primers were evaluated with regard to the formation of hairpins using the mFold tool from the

Table 1 Optimization of PCR conditions

Locus	Microsatellite motifs	T_a (°C)	MgCl ₂ (mM)	Final extension (min)	
				A	B
Rschnμ1	(CA) ₈	69	0.4	00	30
Rschnμ2	(CCAT) ₅	43	1.5	00	30
Rschnμ3	(CA) ₅ TA(CA) ₉	69	1	15	30
Rschnμ4	(ACAT) ₄	68	1	15	30
Rschnμ5	(CCT) ₆	69	0.6	15	30
Rschnμ6	(TACA) ₆	65	0.4	00	30
Rschnμ7	(CA) ₇ AA(CA) ₇	43	1	15	30
Rschnμ8	(TA) ₆ GG(CA) ₆	70	1.5	15	30
Rschnμ9	(CA) ₇	76	1.5	00	30
Rschnμ10	(CA) ₉	70	1	00	30
Rschnμ11	(GT) ₅ (AT) ₈	68	1	15	30
Rschnμ12	(CA) ₁₈	67	0.6	00	30
Rschnμ13	(ACA) ₈	–	–	–	–
Rschnμ14	(CA) ₉	69	1	15	30
Rschnμ15	(TCA) ₆	–	–	–	–
Hraniμ1	(CA) ₆ TA(CA) ₆ AA(CA) ₅	61	3	00	30
Hraniμ2	(AC) ₅ (CA) ₆	67	1.5	00	30
Hraniμ3	(CA) ₈	68	1	15	30
Hraniμ4	(CA) ₉	65	2	00	30
Hraniμ5	(CA) ₅ ...(CA) ₈	60	0.6	00	30
Hraniμ6	(CA) ₁₇	53	0.8	00	30
Hraniμ7	(CA) ₁₈ (CATA) ₅	61	1	00	30
Hraniμ8	(AC) ₅ ...(AC) ₈	70	3	00	30
Hraniμ9	(CA) ₆ ...(CA) ₆	48	1	15	30
Hraniμ10	(GT) ₁₁ (CT) ₆ GTAT (CT) ₅ ...(CT) ₁₀	53	1.5	00	30
Hraniμ11	(TCTA) ₆ TCTCA (TATC) ₃ (TCTA) ₁₁ (TC) ₆ (TATC) ₆ TCA(TATC) ₄ ... (TATC) ₄ TCA (TATC) ₁₁ TCA (TATC) ₈	55	3	00	30
Hraniμ12	(CT) ₉	63	0.8	00	30
Hraniμ13	(TC) ₈ ...(TC) ₅	70	2.5	00	30
Hraniμ14	(CA) ₅ (AC)...(CA) ₇	70	2	00	30
Hraniμ15	(TA) ₇	57	2	00	30
Hraniμ16	(GCA) ₅	61	2.5	00	30

Repeat motifs and T_a , concentrations of magnesium chloride (MgCl₂) and the final extensions used for the 15 SSR loci analyzed

A = final extension time for the first 40 cycles; B = final extension time for the last 10 cycles

Oligo Analyzer 3.1 (IDT). Free energy values of up to dG –3 kcal/mol were tolerated for internal hairpins, and of up to dG –2 kcal/mol for hairpins in the 3' region. The fluorescent substance used to labelling the M13 primer was the specific Cy5 for the ALFexpress™ II (Amersham Biosciences) sequencer. All the oligonucleotides were synthesized using IDT technology.

Amplification conditions

The alterations performed in the protocol of Schuelke [4] involved besides the addition of the labeled primer only in the final cycles, changes in the concentration of reagents and PCR profile.

The amplification reactions were conducted in a total volume of 15 µL, containing 25–100 ng of genomic DNA, 1× PCR buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), 0.2 mM of each dNTP (Amersham Biosciences), different concentrations of magnesium chloride (see Table 1), 0.6 pmol of chimera primer, 0.6 pmol of the reverse primer, and one unit of Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen). Amplifications were carried out in a Mastercycler gradient thermocycler (Eppendorf) under the following conditions: 5 min at 94°C followed by 40 cycles of 30 s at 94°C, 45 s at 43–76°C (see Table 1) to anneal the primers, and 45 s at 72°C for fragment extension. At the end of these first cycles, the PCR was interrupted (paused) at 72°C, and 1 pmol of the Cy5-labeled M13 universal primer was added to each reaction. The eppendorfs were subjected to a new PCR cycle protocol, consisting of final 10 cycles of 30 s at 94°C, 45 s at 53°C, and 45 s at 72°C. Additional extensions were carried out at the end of the last

cycles for all the loci, and at the end of the first cycles for some of them, as shown in Table 1. We applied the method established by Schuelke [4] and a control reaction from which the chimera primer was absent to the same loci (eight loci tested—7 *R. schneideri*/1 *H. raniceps*) in order to identify possible homologies between the labeled primer and the genomes of two species.

Analysis of the alleles

The fragments present in the 1 µL of the PCR product were separated in 8% polyacrylamide denaturing gel in an ALFexpress™ II (Amersham Biosciences) automatic DNA sequencer. Amplicon size was estimated by the Allele Locator 1.03 software (Amersham Biosciences), based on the internal and external standards provided by the manufacturer. The software Micro-Checker 2.2.3 [8] was employed for identifying artifacts that occur during the PCR amplification such as stuttering and short allele dominance.

Results and discussion

Standard method

The results in Fig. 2 indicate that the labeled universal primer amplified unspecific regions, rather than the complementary sequence of the tail incorporated into the SSR region. Neilan et al. [3] have suggested that extensive homology between the labeled primer and the target genome prohibits the use of many primers. The results

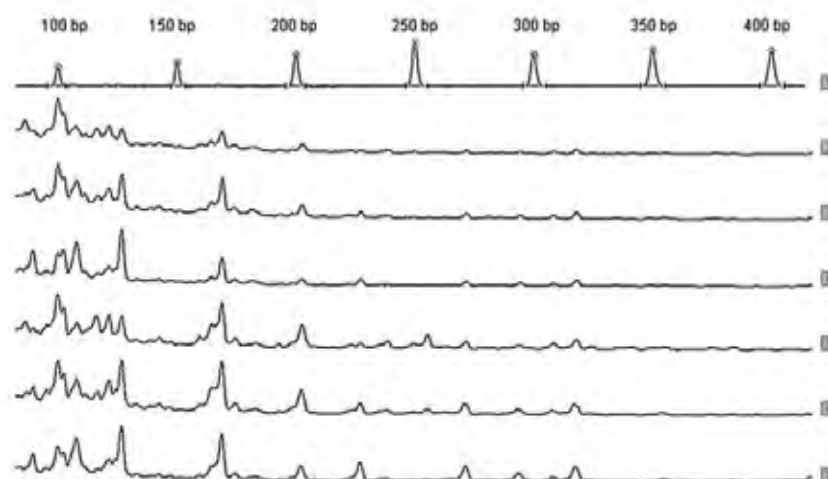
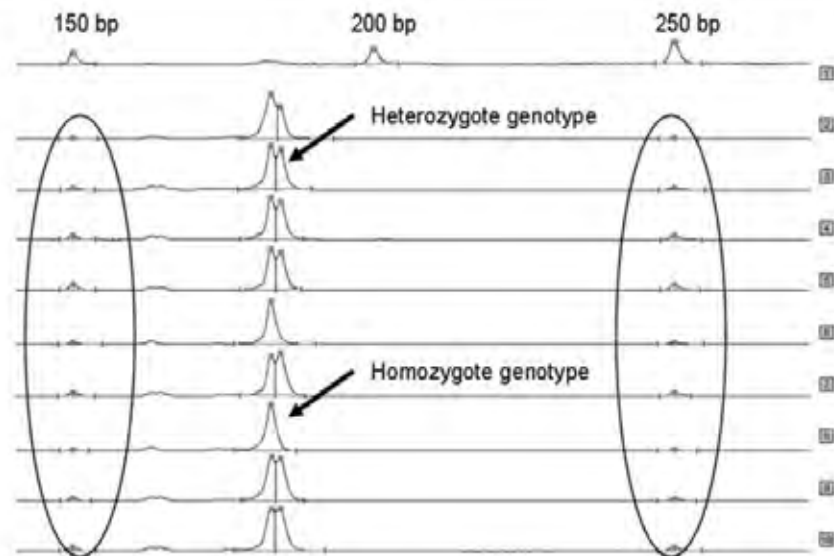


Fig. 2 Chromatogram of the reactions along a temperature gradient (3 mM MgCl₂) for the *Rschn1* locus. Lines 2 (52°C), 3 (54°C), and 4 (56°C) show the products amplified by the standard technique Schuelke (2000), while lines 5 (52°C), 6 (54°C), and 7 (56°C) indicate those amplified in the absence of the chimera primer (control

reaction). The locus presented similar results of the experiments with or without the chimera primer, where the SSR sequence was not amplified (lack of amplification of the expected 184 bp product—absent peak) but many amplified of the unspecific regions. Line 1 = external pattern (100–400 bp)

Fig. 3 Chromatogram of the SSR genotyping (same locus of the Fig. 2 “Rschn1”; peaks indicated by arrows). Amplicons with high content of DNA (from the target regions) and reduced quantities of unspecific amplifications, stutter bands and noise. Line 1 = external pattern (150–250 bp). Circled peaks represent the internal patterns of 150 and 250 bp



obtained here indicate that there is extensive homology between the M13 sequence and the target genome of two species, which resulted in the unspecific amplifications (in all 8 loci evaluated) of the labeled primer during the initial cycles, especially when the T_a of the specific primers (during the first cycles) was close to that of the labeled primer, which is 53°C in the case of M13. The labeled M13 primer was able to amplify at T_a up to 62°C. Given this, the genome-specific primers used in the first cycles that present T_a in this range will be of limited usefulness where the target genome presents extensive homology with the labeled primer.

In addition, competition for the template between the three primers almost certainly provoked a major inhibition of the chimera primer which is not only larger (42 bp on average), but also present at smaller concentrations. Some authors have suggested that long primers tend to be more unstable, which make difficult the annealing of the target genome [9, 10]. This inhibition was also observed with the M13, given that peaks were slightly larger when the tailed primer was absent (Fig. 2).

Modified amplification procedure

Established the homology between labeled primer and genome, we applied the protocol developed in the present study for all 31 loci. Satisfactory amplification was verified for 29 loci, indicating a success rate of 94% (Table 1). Some of the loci which exhibited an excess of stutter peaks to the product presented better quality when 15 min of final extension were included at the end of the initial cycles. This was probably due to the time necessary for the addition of the extra dA at the 3' end of the products amplified during this step.

Once the amplification of each locus was optimized in terms of temperature, concentration of $MgCl_2$ and final extension, the PCR products presented the required characteristics for genotyping (Fig. 3). This quality of PCR products (genotypes data) was confirmed by Micro-Checker 2.2.3 software [8] that did not indicate stuttering or large allelic dropout in any loci.

Addition of the labeled primer only in the last 10 cycles resulted in a considerable increase in the accuracy of the amplification (reducing nonspecific amplification) of the templates multiplied in the initial 40 cycles, including the target region with complementary sequence of the tail incorporated. This process also minimizes competition among the primers, considering that the tailed primer was used up in the final cycles. Even if the labeled primer does amplify some region of the genome by homology (unspecific amplifications) during the final 10 cycles, this product will not be detected or detected weakly (low peak) by the laser system because of the small number of copies.

The unspecific products produced by amplification with the labeled primer in target genome can cause absence or decrease amplification of the locus of interest and also false interpretation of the analysis, when the unspecific fragments generated are of equal or approximated size to the expected amplicon. In this case the fragment to be analyzed does not represent the target region causing genotyping errors.

The protocol applied here to the genome of amphibians appears to be valid for a wide variety of organisms, being recommended for the investigation of organisms with large genomes (>4 Mb), in which there is an increased probability of unspecific amplification between the genome and the labeled primer. These organisms include green algae,

angiosperms, protozoa, lunged and cartilaginous fish, crustaceans, insects and platyhelminths [11]. The method describes here is potentially useful for the analysis of polymorphic sequences in the genome.

Acknowledgments We are grateful to the São Paulo State Research Foundation (FAPESP) and the Brazilian National Research Council (CNPq) for their financial support.

References

1. Steffens DL, Sutter SL, Roemer SC (1993) An alternate universal forward primer for improved automated DNA sequencing of M13. *Biotechniques* 15:580–582
2. Oetting WS, Lee HK, Flanders DJ, Wiesner GL, Sellers TA, King RA (1995) Linkage analysis with multiplexed short tandem repeat polymorphisms using infrared fluorescence and M13 tailed primers. *Genomics* 30:450–458. doi:10.1006/geno.1995.1264
3. Neilan BA, Wilton AN, Jacobs D (1997) A universal procedure for primer labelling of amplicons. *Nucleic Acids Res* 25:2938–2939. doi:10.1093/nar/25.14.2938
4. Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat Biotechnol* 18:233–234. doi:10.1038/72708
5. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning—a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, USA
6. Rozen S, Skaletsky HJ (2000) Primer 3 on the www for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology*, Humana press, Totowa, pp 365–386
7. Abd-Elsalam KA, Aly IN, Abdel-Satar MA, Khalil MS, Verreet JA (2003) PCR identification of *Fusarium* genus based on nuclear ribosomal-DNA sequence data. *Afr J Biotechnol* 2:82–85
8. Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4:535–538. doi:10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x
9. Wu DY, Ugozzoli L, Pal BK, Wallace RB (1991) The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. *DNA Cell Biol* 10:233–238. doi:10.1089/dna.1991.10.233
10. Singh VK, Govindarajan R, Naik S, Kumar A (2000) The effect of hairpin structure on PCR amplification efficiency. *Mol Biol Today* 1:67–69
11. Gregory TR (2005) Synergy between sequence and size in large-scale genomics. *Nat Rev Genet* 6:699–708. doi:10.1038/nrg1674

4 CAPÍTULO III: DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES EM ANFÍBIOS

Artigo 4: MOLECULAR ECOLOGY RESOURCES PRIMER DEVELOPMENT CONSORTIUM et al. Permanent Genetic Resources added to Molecular Ecology Resources Database 1 May 2009–31 July 2009. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, n. 6, p. 1460-1466, 2009 (PUBLICADO ON-LINE EM 29 DE SETEMBRO DE 2009). Original manuscript entitled Isolation and of polymorphic microsatellite loci in the toad species *Rhinella schneideri* by ARRUDA, M. P. et al. available in Molecular Ecology Resources database accessions 37594–37604 - <http://tomato.biol.trinity.edu/manuscripts/9-6/mer-09-0184.pdf>.

Artigo 5: ARRUDA, M. P. et al. Development of eleven polymorphic microsatellite markers for the Chaco Treefrog, *Hypsiboas raniceps*. **Conservation Genetics Resources**, DOI 10.1007/s12686-010-9172-y. 2010 (PUBLICADO ON-LINE EM 22 DE JANEIRO DE 2010).

Artigo 6: ARRUDA, M. P. et al. Twelve polymorphic microsatellite loci developed and optimized from the *Leptodactylus chaquensis*. **Conservation Genetics Resources**, 2010 (A SER SUBMETIDO).

4.1 ARTIGO 4

MOLECULAR ECOLOGY
RESOURCES

Molecular Ecology Resources (2009) 9, 1460–1559

PERMANENT GENETIC RESOURCES NOTE

Permanent Genetic Resources added to Molecular Ecology
Resources Database 1 May 2009–31 July 2009

MOLECULAR ECOLOGY RESOURCES PRIMER DEVELOPMENT CONSORTIUM,¹ GLENN R. ALMANY,² MAURÍCIO P. DE ARRUDA,³ WOLFGANG ARTHOFER,⁴ Z. K. ATALLAH,⁵ STEVEN R. BEISSINGER,⁶ MICHAEL L. BERUMEN,^{7,2} S. M. BOGDANOWICZ,⁸ S. D. BROWN,⁹ MICHAEL W. BRUFORD,¹⁰ C. BURDINE,¹¹ JEREMIAH W. BUSCH,¹² NATHAN R. CAMPBELL,¹³ D. CAREY,¹⁴ BRYAN C. CARSTENS,¹⁵ K. H. CHU,¹⁶ MARC A. CUBETA,¹⁷ J. P. CUDÁ,¹⁸ ZHAOXIA CUI,¹⁹ L. E. DATNOFF,²⁰ J. A. DÁVILA,²¹ EMILY S. DAVIS,²² R. M. DAVIS,⁵ ONNO E. DIEKMANN,²³ EDUARDO EIZIRIK,^{24,25} J. A. FARGALLO,²⁶ FABIANO FERNANDES,²⁷ HIDEO FUKUDA,²⁸ L. R. GALE,²⁹ ELIZABETH GALLAGHER,¹⁵ YONGQIANG GAO,³⁰ PHILIPPE GIRARD,⁶ ANNA GODHE,³¹ EVONNILDO C. GONÇALVES,³² LICINIA GOUVEIA,²³ AMBER M. GRAJCZYK,³³ M. J. GROSE,³⁴ ZHIFENG GU,³⁵ CHRISTER HALLDÉN,³⁶ KAROLINA HÄRNSTRÖM,³¹ AMANDA H. HEMMINGSEN,³⁷ GERALD HOLMES,¹⁷ C. H. HUANG,³⁸ CHUAN-CHIN HUANG,³⁹ S. P. HUDMAN,⁴⁰ GEOFFREY P. JONES,^{2,41} LOUKAS KANETIS,¹⁷ IDHYA KARUNASAGAR,⁴² INDRANI KARUNASAGAR,⁴² NUSHA KEYGHOBADI,⁴³ S. J. KLOSTERMAN,⁴⁴ PAGE E. KLUG,⁴⁵ J. KOCH,¹⁴ MARGARET M. KOOPMAN,¹⁵ KIRSTEN KÖPPLER,⁴⁶ ERIKO KOSHIMIZU,²⁸ SUSANNE KRUMBÖCK,⁴⁷ T. KUBISIAK,¹¹ J. B. LANDIS,^{34,48} MARIO L. LASTA,⁴⁹ CHOW-YANG LEE,⁵⁰ QIANQIAN LI,^{19,54} SHOU-HSIEN LI,⁵¹ RONG-CHIEN LIN,⁵¹ M. LIU,⁵² NA LIU,³⁵ W. C. LIU,⁵³ YUAN LIU,^{19,54} A. LOISEAU,⁵⁵ WEISHA LUAN,^{19,54} K. K. MARUTHACHALAM,⁵ HELEN M. McCORMICK,⁵⁵ ROHAN MELLICK,^{56,57} P. J. MONNAHAN,⁴⁰ ELIANA MORIELLE-VERSUTE,³ TOMÁS E. MURRAY,^{22,58} SHAWN R. NARUM,¹³ KATIE NEUFELD,¹⁷ P. J. G. DE NOVA,²¹ PETER S. OJAMBO,¹⁷ NOBUAKI OKAMOTO,²⁸ AHMAD SOFIMAN OTHMAN,⁵⁰ W. A. OVERHOLT,⁵⁹ RENATA PARDINI,⁶⁰ IAN G. PATERSON,⁶¹ OLIVIA A. PATTY,⁵⁵ ROBERT J. PAXTON,²² SERGE PLANES,⁶² CAROLYN PORTER,⁵⁶ MORGAN S. PRATCHETT,⁷ THOMAS PUTTKER,²⁷ GORDANA RASIC,⁴³ BILAL RASOOL,⁴⁷ O. REY,⁵⁵ MARKUS RIEGLER,⁶³ C. RIEHL,^{64, 65} JOHN M. K. ROBERTS,⁶⁶ P. D. ROBERTS,⁶⁷ ELISABETH ROCHER,⁶² KEVIN J. ROE,⁶⁸ MAURIZIO ROSSETTO,⁵⁶ DANIEL E. RUZZANTE,⁶¹ TAKASHI SAKAMOTO,²⁸ V. SARAVANAN,⁴² CLADINARA ROBERTS SARTURI,²⁴ ANKE SCHMIDT,²⁷ MARIA PAULA CRUZ SCHNEIDER,³² HANNES SCHULER,⁴⁷ JEANNE M. SERB,³⁷ ESTER T. A. SERRÃO,²³ YAOHUA SHI,³⁵ ARTUR SILVA,³² Y. W. SIN,¹⁶ SIMONE SOMMER,²⁷ CHRISTIAN STAUFFER,⁴⁷ CARLOS AUGUSTO STRÜSSMANN,²⁸ K. V. SUBBARAO,⁵ CRAIG SYMS,⁴¹ FENG TAN,¹⁹ EUGENIO DANIEL TEJEDOR,⁶⁹ SIMON R. THORROLD,⁷ ROBERT N. TRIGIANO,⁷⁰ MARIA I. TRUCCO,⁴⁹ MIRIAM TIEKO NUNES TSUCHIYA-JEREP,²⁴ P. VERGARA,⁷¹ MIRIAM S. VAN DE VLIET,²³ PHILLIP A. WADL,⁷⁰ AIMIN WANG,³⁵ HONGXIA WANG,¹⁹ R. X. WANG,⁵² XINWANG WANG,⁷² YAN WANG,³⁵ ANDREW R. WEEKS,⁶⁶ FUWEN WEI,⁷³ WILLIAM J. WERNER,¹² E. O. WILEY,³⁴ D. A. WILLIAMS,³³ RICHARD J. WILKINS,⁵⁵ SAMANTHA M. WISELY,⁴⁵ KIMBERLY A. WITH,⁴⁵ DANHUA WU,¹⁹ CHENG-TE YAO,^{74,75} CYNTHIA YAU,⁷⁶ BENG-KEOK YEAP,⁵⁰ BAO-PING ZHAI,⁷⁷ XIANGJIANG ZHAN,^{10,73} GUO-YAN ZHANG,⁷⁸ S. Y. ZHANG,⁵³ RU ZHAO^{52,53} and LIFENG ZHU⁷³

¹Molecular Ecology Resources Editorial Office, 6270 University Blvd, Vancouver, BC, V6T 1Z4, Canada; ²ARC Centre of Excellence for Coral Reef Studies, James Cook University, Townsville, Queensland, 4811, Australia; ³Laboratório de Chiroptera, Departamento de Zoologia e Botânica, UNESP - Universidade Estadual Paulista - Campus de São José do Rio Preto; ⁴Institute of Ecology, University of Innsbruck, Innsbruck, Austria; ⁵Department of Plant Pathology, University of California-Davis, Davis, CA, USA; ⁶Department of Environmental Science, Policy and Management, Division of Ecosystem Sciences, 137 Mulford Hall, University of California, Berkeley, CA 94720-3114, USA; ⁷Biology Department, Woods Hole Oceanographic Institution, Woods Hole, MA, 02543, USA; ⁸Department of Ecology and Evolutionary Biology, Cornell University, E145 Corson Hall, Ithaca, NY 14853, USA; ⁹Marine Biology and Fisheries, Rosenstiel School of Marine and Atmospheric Sciences, University of Miami, Miami, FL 33149, USA; ¹⁰Biodiversity and Ecological Processes Group, Cardiff School of Biosciences, Cardiff University, Cathays Park, Cardiff, CF10 3AX, UK; ¹¹USDA Forest Service, Southern Research Station, Southern Institute of Forest Genetics, 23332 Highway 67, Saucier, MS 39574, USA; ¹²School of Biological Sciences, Center for Reproductive Biology, Washington State University, PO Box 644236, Pullman, WA 99164, USA; ¹³Columbia River Intertribal Fish Commission, 3059 F National Fish Hatchery Rd Hagerman, ID 83332, USA; ¹⁴USDA Forest Service, Northern Research Station, Forestry Sciences Laboratory, Delaware, OH 43015, USA; ¹⁵Department of Biological Sciences, 202 Life Sciences Bldg, Louisiana State University, Baton Rouge, LA 70803, USA;

PERMANENT GENETIC RESOURCES NOTE 1461

- ¹⁶Simon F. S. Li Marine Science Laboratory, Department of Biology, The Chinese University of Hong Kong, Shatin, Hong Kong;
- ¹⁷Department of Plant Pathology, North Carolina State University, Raleigh, NC 27650, USA; ¹⁸Department of Entomology and Nematology, University of Florida, Building 970 Natural Area Drive, Gainesville, FL 32611, USA; ¹⁹EMBL, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071, China; ²⁰Department of Plant Pathology and Crop Physiology, Louisiana State University, Baton Rouge, LA 70803, USA; ²¹Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos, IREC (CSIC-UCLM-JCCM), Ronda de Toledo s/n 13005 Ciudad Real, Spain; ²²School of Biological Sciences, Queen's University Belfast, 97 Lisburn Road, Belfast BT9 7BL, UK; ²³CCMAR-CIMAR, F.C.M.A- University of Algarve, Gambelas, P-8005-139 Faro, Portugal; ²⁴Faculdade de Biociências, PUICRS, Avenida Ipiranga 6681, Prédio 12C, Porto Alegre, RS 90619-900, Brazil; ²⁵Instituto Pró-Carnívoros, São Paulo, Brazil; ²⁶Department of Evolutionary Ecology, Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC), J. Gutiérrez Abascal 2, 28006 Madrid, Spain; ²⁷Leibniz-Institute for Zoo and Wildlife Research, Alfred-Kowalke-Str. 17, D-10315 Berlin, Germany; ²⁸Graduate School of Marine Science and Technology, Tokyo University of Marine Science and Technology, 4-5-7 Konan, Minato, Tokyo, 108-8477, Japan; ²⁹Department of Plant Pathology, University of Minnesota, St. Paul, MN 55108, USA; ³⁰Motianling Nature Reserve, Mian County, Shaanxi 724201, China; ³¹Department of Marine Ecology, University of Gothenburg, Box 461, SE 405 30 Göteborg, Sweden; ³²Laboratório de Polimorfismo de DNA, Instituto de Ciências Biológicas, UFPA Universidade Federal do Pará, Belém, Brasil; ³³Department of Biology, 2800 S. University Dr., Texas Christian University, Fort Worth, TX 76129, USA; ³⁴Natural History Museum & Biodiversity Institute, University of Kansas, Dyche Hall, 1345 Jayhawk Boulevard, Lawrence, KS 66045, USA; ³⁵Ocean College, Hainan University, Key Laboratory of Tropic Biological Resources, MOE, Hainan Key Laboratory of Tropical Hydrobiological Technology, 58 Renmin Road, Haikou, Hainan 570228, China; ³⁶Dept Clinical Chemistry, SweGene Center for Profiling Polygenic Disease, Malmö University Hospital, SE-20502 Malmö, Sweden; ³⁷Department of Ecology, Evolution and Organismal Biology, 253 Bessey Hall, Iowa State University, Ames, IA, 50011 USA; ³⁸Department of Plant Pathology, University of Florida, Gainesville, FL 32611, USA; ³⁹Institute of Ecology and Evolutionary Biology, National Taiwan University, Taipei 106, Taiwan; ⁴⁰Department of Biology, Truman State University, Kirksville, MO 63501, USA; ⁴¹School of Marine and Tropical Biology, James Cook University, Townsville, Qld, 4811, Australia; ⁴²Department Fishery Microbiology, College of Fisheries, Karnataka Veterinary Animal and Fisheries Sciences University, PB No 527, Mangalore 575 002, India; ⁴³Department of Biology, University of Western Ontario, 1151 Richmond Street, London, ON, Canada, N6A 5B7; ⁴⁴USDA-ARS, Salinas, USA; ⁴⁵Division of Biology, Kansas State University, Ackert Hall, Manhattan (KS), 66506 USA; ⁴⁶Federal Research Centre for Cultivated Plants, Julius Kühn Institute, Institute for Plant Protection in Fruit Crops and Viticulture, Dossenheim, Germany; ⁴⁷Institute of Forest Entomology, Forest Pathology and Forest Protection, Department of Forest & Soil Sciences, University of Natural Resources and Applied Life Sciences (BOKU), Vienna, Austria; ⁴⁸Department of Ecology & Evolutionary Biology, University of Kansas, Lawrence, KS 66045, USA; ⁴⁹Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP), Paseo Victoria Ocampo N° 1, B-7602-HSA, Mar del Plata, Argentina; ⁵⁰School of Biological Sciences, Universiti Sains Malaysia, 11800 Penang, Malaysia; ⁵¹Department of Life Science, National Taiwan Normal University, Taipei 116, Taiwan; ⁵²College of Marine Sciences, Zhejiang Ocean University, Zhejiang 316000, China; ⁵³School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai 200062, China; ⁵⁴Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100039, China; ⁵⁵INRA UMR Centre de Biologie et de Gestion des Populations (INRA/IRD/Cirad/Montpellier SupAgro), Campus international de Baillarguet, Montferrier-sur-Lez, France; ⁵⁶National Herbarium of NSW, Botanic Gardens Trust, Mrs Macquaries Rd, Sydney NSW 2000, Australia; ⁵⁷Earth and Environmental Sciences, University of Adelaide, SA 5005, Australia; ⁵⁸Current Address: Crops Research Centre, Teagasc, Oak Park, Carlow, Co. Carlow, Ireland; ⁵⁹Biological Control Research and Containment Laboratory, University of Florida, 2199 South Rock Road, FL 34945, USA; ⁶⁰Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, Rua do Matão, travessa 14, 101/Departamento de Zoologia, Cidade Universitária, 05508-900 - São Paulo, Brazil; ⁶¹Marine Gene Probe Laboratory, Department of Biology, Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia, B3H 4J1, Canada; ⁶²UMR 5244, CNRS-EPHE-UPVD, Centre de Biologie et d'Ecologie Tropicale et Méditerranéenne, Université de Perpignan, 66860 Perpignan Cedex, France; ⁶³Centre for Plants and the Environment, University of Western Sydney, Locked Bag 1797, Penrith South DC, NSW 1797, Australia; ⁶⁴Department of Ecology and Evolutionary Biology, Princeton University, 106A Guyot Hall, Princeton, NJ 08544, USA; ⁶⁵Department of Migration and Immuno-ecology, Max Planck Institute for Ornithology, Schlossallee 2, 78315 Radolfzell, Germany; ⁶⁶Centre for Environmental Stress and Adaptation Research, Departments of Genetics, The University of Melbourne, Parkville, Vic. 3010, Australia; ⁶⁷Southwest Florida Research and Education Center, University of Florida, Immokalee, FL 34142, USA; ⁶⁸Department of Natural Resource Ecology and Management, 339 Science Hall II, Iowa State University, Ames, IA, 50011 USA; ⁶⁹Veterinary College, La Plata University, Calle 60 y 118 s/n (1900), Provincia de Buenos Aires, Argentina; ⁷⁰Department of Entomology and Plant Pathology, University of Tennessee, Knoxville, TN 37996, USA; ⁷¹Aberdeen Centre for Environmental Sustainability (ACES), University of Aberdeen & The Macaulay Institute, School of Biological Sciences, Tillydrone Avenue, Aberdeen AB24 2TZ, UK; ⁷²Texas AgriLife Research and Extension Center, Texas A & M University System, Dallas, TX 75252, USA; ⁷³Key Lab of Animal Ecology and Conservation Biology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, No 1, Beichenxilu, Beijing 100101, China; ⁷⁴Division of Zoology, Taiwan Endemic Species Research Institute, Ji-ji, Nantou County 552, Taiwan; ⁷⁵Department of Life Sciences, National Cheng-Kung University, Tainan 701, Taiwan;

1462 PERMANENT GENETIC RESOURCES NOTE

⁷⁶Swire Institute of Marine Science, Division of Ecology & Biodiversity, School of Biological Sciences, The University of Hong Kong, Pokfulam Road, Hong Kong; ⁷⁷Department of Entomology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

⁷⁸Plant Protection and Quarantine Station of Henan, Zhengzhou 450002, China

Abstract

This article documents the addition of 512 microsatellite marker loci and nine pairs of Single Nucleotide Polymorphism (SNP) sequencing primers to the Molecular Ecology Resources Database. Loci were developed for the following species: *Alcippe morrissonia morrissonia*, *Bashania fangiana*, *Bashania fargesii*, *Chaetodon vagabundus*, *Colletes floralis*, *Coluber constrictor flaviventris*, *Coptotermes gestroi*, *Crotophaga major*, *Cyprinella lutrensis*, *Danaus plexippus*, *Fagus grandifolia*, *Falco tinnunculus*, *Fletcherimyia fletcheri*, *Hydrilla verticillata*, *Laterallus jamaicensis coturniculus*, *Leavenworthia alabamica*, *Marmosops incanus*, *Miichthys miiuy*, *Nasua nasua*, *Noturus exilis*, *Odontesthes bonariensis*, *Quadrula fragosa*, *Pinctada maxima*, *Pseudaletia separata*, *Pseudoperonospora cubensis*, *Podocarpus elatus*, *Portunus trituberculatus*, *Rhagoletis cerasi*, *Rhinella schneideri*, *Sarracenia alata*, *Skeletonema marinoi*, *Sminthurus viridis*, *Syngnathus abaster*, *Uroteuthis (Photololigo) chinensis*, *Verticillium dahliae*, *Wasmannia auropunctata*, and *Zygochlamys patagonica*. These loci were cross-tested on the following species: *Chaetodon baronessa*, *Falco columbarius*, *Falco eleonora*, *Falco naumanni*, *Falco peregrinus*, *Falco subbuteo*, *Didelphis aurita*, *Gracilinanus microtarsus*, *Marmosops paulensis*, *Monodelphis Americana*, *Odontesthes hatcheri*, *Podocarpus grayi*, *Podocarpus lawrencei*, *Podocarpus smithii*, *Portunus pelagicus*, *Syngnathus acus*, *Syngnathus typhle*, *Uroteuthis (Photololigo) edulis*, *Uroteuthis (Photololigo) duvauceli* and *Verticillium albo-atrum*. This article also documents the addition of nine sequencing primer pairs and sixteen allele specific primers or probes for *Oncorhynchus mykiss* and *Oncorhynchus tshawytscha*; these primers and assays were cross-tested in both species.

This article documents the addition of 512 microsatellite marker loci and nine pairs of Single Nucleotide Polymorphism (SNP) genotyping primers to the Molecular Ecology Resources Database. Table 1 contains information on the focal species, the number of loci developed, any other species the loci were tested in and the accession numbers for the loci in both the Molecular Ecology Resources Database and GenBank. The authors responsible for each set of loci are listed in the final column. Table 2 presents information on SNP genotyping resources added to the

MER database, and presents data on the focal species, the number of sequencing primer pairs, the observed number of SNPs, other species the loci were tested in, and the number of allele specific primers or probes. The MER database and Genbank accession numbers and the authors responsible are also listed. A full description of the development protocol for the loci presented here can be found on the Molecular Ecology Resources Database (<http://tomato.biol.trinity.edu/>).

PERMANENT GENETIC RESOURCES NOTE 1463

Table 1 Information on the focal species, the number of loci developed, any other species the loci were tested in and the accession numbers for the loci in both the Molecular Ecology Resources Database and Genbank. The authors responsible for each set of loci are listed in the final column

Species	No. of primers developed	Other species tested	MER database no.	GenBank Accession no.	Authors
<i>Alcippe morrisonia</i>	15	n/a	37424–37431 37433–37438	DQ858940–DQ858948, DQ858950–DQ858953, FJ716585, FJ716586	Rong-Chien Lin, Chuan-Chin Huang, Shou-Hsien Li, Cheng-Te Yao
<i>Bashania fangiana</i>	25	n/a	37708–37732	GQ281353–GQ281377	Xiangjiang Zhan, Fuwen Wei, Michael W. Bruford
<i>Bashania fargesii</i>	17	n/a	37691–37707	GQ267715–GQ267731	Xiangjiang Zhan, Lifeng Zhu, Yongqiang Gao, Fuwen Wei, Michael W. Bruford
<i>Chaetodon vagabundus</i>	15	<i>Chaetodon baronessa</i>	37840–37854	GQ281437–GQ281451	Michael L. Berumen, Elisabeth Rochel, Glenn R. Almany, Simon R. Thorrold, Geoffrey P. Jones, Morgan S. Pratchett, Craig Syms, Serge Planes
<i>Colletes floralis</i>	9	n/a	37651–37659	FJ041148–FJ041150, EF137744–EF137749	Tomás E. Murray, Emily S. Davis, Robert J. Paxton
<i>Coluber constrictor flaviventris</i>	12	n/a	37758–37769	GQ371177–GQ371188	Page E. Klug, Kimberly A. With, Samantha M. Wisely
<i>Coptotermes gestroi</i>	11	n/a	37779–37789	GQ412733–GQ412743	Beng-Keok Yeap, Ahmad Sofiman Othman, Chow-Yang Lee
<i>Crotophaga major</i>	12	n/a	37778, 37790–37800	GQ144418–GQ144429	C. Riehl S. M. Bogdanowicz
<i>Cyprinella lutrensis</i>	29	n/a	37521–37549	GQ169555–GQ169567	PJ Monnahan, Grose, MJ, Landis, JB, Wiley, EO, Hudman, SP
<i>Danaus plexippus</i>	12	n/a	37855–37866	FJ649210, FJ649212–FJ649223	Helen M McCormick, Olivia A. Patty, Richard J Wilkins
<i>Fagus grandifolia</i>	10	n/a	37406–37415	GO248754–GO248763	T. Kubisiak, D. Carey, C. Burdine, J. Koch
<i>Falco tinnunculus</i>	10	<i>F. columbarius</i> , <i>F. eleonora</i> , <i>F. naumanni</i> , <i>F. peregrinus</i> , <i>F. subbuteo</i>	37310–37319	FJ842386–FJ842395	P.J.G. de Nova, J.A. Dávila, P. Vergara, J.A. Fargallo
<i>Fletcherimyia fletcheri</i>	12	n/a	37679–37690	GQ300842–GQ300853	Gordana Rasic, Nusha Keyghobadi
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Lycopersici</i>	27	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Lycopersici</i>	38143–38117	FJ882019–FJ882025	C. H. Huang, L. E. Datnoff, L. R. Gale P. D. Roberts
<i>Hydrilla verticillata</i>	8	n/a	37770–37777	FJ907306–FJ907313	Amber M. Grajczyk, W.A. Overholt, J.P. Cuda, S.D. Brown, D.A. Williams
<i>Laterallus jamaicensis coturniculus</i>	19	n/a	37660–37678	FJ997575–FJ997593	Philippe Girard, Steven R. Beissinger
<i>Leavenworthia alabamica</i>	12	n/a	37161–37172	FJ860908, FJ860911–FJ860913, FJ860915, FJ860918, FJ860920, FJ860921, FJ860926, FJ860928, FJ860930, FJ860933	Jeremiah W. Busch, William J. Werner

1464 PERMANENT GENETIC RESOURCES NOTE

Table 1 (Continued)

Species	No. of primers developed	Other species tested	MER database no.	GenBank Accession no.	Authors
<i>Marmosops incanus</i>	15	<i>Didelphis aurita</i> , <i>Gracilinanus microtarsus</i> , <i>Marmosops paulensis</i> and <i>Monodelphis americana</i>	37173–37187	FJ793928–FJ793937, AJ270097, AY386653, AY386655, AY386664, EF486346	Simone Sommer, Anke Schmidt, Fabiano Fernandes, Thomas Püttker, Renata Pardini
<i>Müchthys müüuy</i>	15	n/a	37801–37815	FJ754034–FJ754048	Ru Zhao, W.C. Liu, M. Liu, S. Y. Zhang, R X Wang
<i>Nasua nasua</i>	15	n/a	37498–37512	FJ914573–FJ914587	Mirian Tieko Nunes Tsuchiya-Jerep, Cladinara Roberts Sarturi, Eduardo Eizirik
<i>Noturus exilis</i>	25	n/a	37733–37757	EU760354–EU760378	SP Hudman, MJ Grose, JB Landis, EO Wiley
<i>Odontesthes bonariensis</i>	17	<i>O. hatcheri</i>	37559–37575	AB375407–AB375410, AB375412–AB375419, AB375421–AB375423, AB375425, AB375426, AB375428	Eriko Koshimizu, Carlos Augusto Strüssmann, Eugenio Daniel Tejedor, Nobuaki Okamoto, Hideo Fukuda, Takashi Sakamoto
<i>Quadrula fragosa</i>	9	n/a	37301–37309	FJ785629–FJ785636, FJ785639	Amanda H. Hemmingsen, Kevin J. Roe, Jeanne M. Serb
<i>Pinctada maxima</i>	16	n/a	37867–37882	FJ607747–FJ607749, FJ607751, FJ607753–FJ607756, FJ607759–FJ607760, FJ607762, FJ607764, FJ607767, FJ607768, FJ607770, FJ607774	Yan Wang, Na Liu, Yaohua Shi, Zhifeng Gu, Aimin Wang
<i>Pseudaletia separata</i>	8	n/a	37292–37295, 37297–37300	FJ896055–FJ896062	Guo-Yan Zhang, Bao-Ping Zhai
<i>Pseudoperonospora cubensis</i>	8	n/a	37513–37520	FJ764997–FJ765004	Loukas Kanetis, Xinwang Wang, Phillip A. Wadl, Katie Neufeld, Gerald Holmes, Peter S. Ojiambo, Marc A. Cubeta, Robert N. Trigiano
<i>Podocarpus elatus</i>	9	<i>P. grayi</i> , <i>P. lawrencei</i> , <i>P. smithii</i> .	37550–37558	FJ935795–FJ935803	Rohan Mellick, Carolyn Porter, Maurizio Rossetto
<i>Portunus trituberculatus</i>	17	<i>P. pelagicus</i>	37634–37650	AF410872 FJ660922 FJ660923–FJ660929 GE342670 GE342703 GE342919 GE468057 GE468081 GE468082 GE468121 GE468190	Zhaoxia Cui, Hongxia Wang, Feng Tan, Danhua Wu, Yuan Liu, Weisha Luan Qianqian Li
<i>Rhagoletis cerasi</i>	13	<i>R. cingulata</i> , <i>R. completa</i> , <i>R. mendax</i> , <i>R. pomonella</i>	37816–37828	GQ149111–GQ149123	Wolfgang Arthofer, Susanne Krumböck, Hannes Schuler, Bilal Rasool, Markus Riegler, Kirsten Köppler, Christian Stauffer
<i>Rhinella schneideri</i>	11	n/a	37594–37604	FJ847928, FJ847930, FJ847931, FJ847933–FJ847940	Maurício P. de Arruda, Eliana Morielle-Versute, Artur Silva, Maria Paula Cruz Schneider, Evoñildo C. Gonçalves
<i>Sarracenia alata</i>	9	n/a	37585–37593	GQ219717–GQ219725	Margaret M. Koopman, Elizabeth Gallagher, Bryan C. Carstens

4.1.1 ARTIGO 4: MANUSCRITO ORIGINAL

1 Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the toad species

2 *Rhinella schneideri*

3

4 Running Head: SSR loci in the toad species *Rhinella schneideri*

5

6 Maurício P. ARRUDA¹, Eliana MORIELLE-VERSUTE¹, Artur SILVA², Maria Paula Cruz

7 SCHNEIDER², and Evonnildo C. GONÇALVES²

8

9 ¹Laboratório de Chiroptera, Departamento de Zoologia e Botânica, UNESP -Universidade

10 Estadual Paulista – Campus de São José do Rio Preto.

11 ²Laboratório de Polimorfismo de DNA, Instituto de Ciências Biológicas, UFPA-

12 Universidade Federal do Pará.

13

1 **Abstract**

2 We developed eleven polymorphic microsatellite loci for *Rhinella schneideri* and
3 optimized PCR for future research. Screened in twenty individuals the number of
4 alleles, observed heterozygosity and polymorphic information content per locus ranged
5 from 2 to 6, 0.10 to 0.85 and 0.0905 to 0.6336, respectively. All loci were in linkage
6 equilibrium, however two loci did not conform Hardy-Weinberg expectations. These
7 independent markers could be useful in ongoing genetic population studies,
8 reproductive isolation mechanisms and construction of genetic map.

9

10 **Keywords:** *Rhinella*, Bufonidae, microsatellite, polymorphism, population genetics

11

12 **Correspondence:** *Maurício Papa de Arruda*, Laboratório de Chiroptera, Departamento de
13 Zoologia e Botânica, Universidade Estadual Paulista – Street Cristovão Colombo, 2265, CEP
14 15054-000, São José do Rio Preto/SP, Brazil. Phone number: +55 (91) 8160-2509; Fax
15 number: +55 (17) 3221-2374; e-mail: arrudabio@gmail.com

16

1 The Rococo Toad, *Rhinella schneideri* is the most widespread amphibian species in South
2 America with broad distribution on the Atlantic coast from Brazil inland through Paraguay to
3 central Bolivia; and southwest to northern and central Argentina and northern Uruguay
4 (Bastos *et al.* 2003). This species presents higher abundance in anthropogenic landscapes
5 (Cochran 1955), however its ecology is poorly known (Guix 1993), being considered a
6 species of habitat generalist (Silvano & Pimenta 2003). According to Haddad & Abe (1999),
7 as a consequence of the deforestations *R. schneideri* has been expanding its geographically
8 limits becoming particularly interesting for studies of founder events as well like a model
9 organism to evaluate processes of landscape fragmentation and habitat reduction (Colli *et al.*
10 2002; Whiteley *et al.* 2006).

11 We reported here the characterization of polymorphic microsatellite loci for *R.*
12 *schneideri* usefull in an ongoing study population genetics, mechanisms of reproductive
13 isolation and constructing genetic mapping.

14 Two subgenomic libraries enriched for microsatellite were constructed and screened
15 for (CA)_n and (CT)_n repeats following a modified protocol of Kijas *et al.* (1994). Genomic
16 DNA was prepared from muscle tissue of two adults collected in the municipally of Sales and
17 Santo Antônio do Aracanguá (Vicentinópolis district) from Northwest of São Paulo State,
18 Brazil. DNA was extracted using standard protocol according Sambrook *et al.* (1989). Ten
19 micrograms of genomic DNA was digested with *Sau3AI* and the 300-1000 bp size fraction
20 were purified using a illustra™ GFX™ PCR and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare)
21 and ligated to *Sau3AI* adaptors (AdapF/AdapR) using T4 DNA ligase. Number of copies of
22 the ligated DNA fragments were amplified by polymerase chain reaction - PCR (18 cycles)
23 and purified. Adaptors-ligated DNA was denatured and hybridized to biotinylated (CA)₁₅ and
24 CT₁₂) probes at 55°C for 5h. We recovered fragments containing microsatellite repeats using

1 streptavidin-coated magnetic beads (Dyna). The sample was eluted in 100 µL TE buffer, and
2 a PCR using AdapF primer was conducted to make fragments double-stranded. PCR products
3 were ligated into pGEM-T Easy Vector (Promega) overnight and then desalted before
4 electroporation into *Escherichia coli* TOP 10 (Invitrogen). We plated cells on 2XYT-
5 agar/Ampicilin/X-gal and after incubation to 37°C for 14 hours; white colonies were
6 transferred for 96-Well plates with highly enriched medium Tartoff-Hobbs Broth/Ampicilin
7 and again grown to 37°C for 6 hours. The libraries were glycerolized and stored at -20°C.

8 A total of 480 clones were sequenced with M13 forward and reverse primers using
9 DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit from MegaBACE (GE Healthcare) on
10 MegaBACE™ 1000 DNA Analysis System (GE Healthcare). Sequences were analyzed using
11 Troll software (Castelo *et al.* 2002) finding 252 clones with repetitive sequences. CA₁₅ probe
12 had a better efficiency in the number (57% vs. 38% of microsatellites motifs) and size (the
13 smallest size considered was five repetitions) over of captured microsatellites CT₁₂ probe.
14 Microsatellites with a high number of repeats were edited and trimmed from pGEM-T vector
15 and *Sau3AI* adaptors, aligned using Bioedit software (Hall 1999) and redundant clones were
16 removed. Primers were designed based on the flanking regions of 13 loci using Primer 3
17 software (Rozen & Skaletsky 2000). M13-tail was added at its 5' end of the forward primers
18 of the identical sequence to labeled universal primer with Cy5 and the PCR reaction was
19 carried using dye-labelled universal primer method described by Schuelke (2000), with
20 modifications.

21 Genotyping was realized with samples of 20 individuals adults collected from a
22 locality (municipally of Sales - 21°24'S; 49°30'O) of Northwest of São Paulo State, Brazil.
23 PCRs were carried out in a total volume of 15 µL with 25-100 ng template DNA, 1 x PCR
24 buffer (containing 20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl) 0.2 mM of each dNTPs, 0.4-1.5

1 mM MgCl₂ (Table 1), 0.6 pmol of each forward and reverse primer and one unit of Platinum®
2 Taq DNA Polymerase (Invitrogen). All PCRs were performed using the following conditions:
3 94°C for 5 min followed by 40 cycles of 30 s at 94°C, 45 s at primer-specific annealing
4 temperature (Table 1), and 45 s at 72°C. At the end of these 40 cycles, the PCR was
5 interrupted (paused) at 72°C, and 1 pmol of the Cy5-labeled M13 universal primer was added
6 to each reaction and then PCRs were subjected to a new profile, consisting of 10 cycles of 30
7 s at 94°C, 45 s at 53°C, 45 s at 72°C and a final extension of 30 min at 72°C. PCR products
8 were run on 6% denaturing polyacrylamide gels using an ALFexpress II automatic DNA
9 processor and alleles were scored through Allele Locator 1.03 (Amersham Biosciences) using
10 external size standard (50-500 pb) and internal size standard suitable for different individual
11 locus (Amersham Biosciences).

12 We calculated the number of alleles at each locus, observed and expected
13 heterozygosities using Popgene 1.32 (Yeh *et al.* 1997). Loci were examined for heterozygote
14 excess and deficiency, departure from Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) and linkage
15 disequilibrium using the GenePop 4.0.9 software package (Rousset 2008). The power of
16 individual discrimination (identity analysis) and polymorphic information content were
17 performed using software Cervus 3.0.3 (Marshall *et al.* 1998). Probabilities of significance
18 were computed through the Markov Chain Method (Guo & Thompson 1992) with 10000
19 dememorization steps and 100 batches of 5000 iterations per batch as implemented in
20 GenePop 4.0.9 software. Levels of significance were corrected for multiple tests (Rice 1989).
21 We used Micro-Checker version 2.2.3 (Oosterhout *et al.* 2004) to check microsatellite data for
22 null alleles calculated following Brookfield (1996) and scoring errors at each locus.

23 Only *Rschu2* and *Rschu5* locus (FJ847929 and FJ847932 GenBank accession number
24 respectively) were monomorphic in the population analyzed while eleven polymorphic loci

1 showed of 2 to 6 alleles, observed heterozygosities 0.10 to 0.85 and polymorphic information
2 content ranged from 0.0905 to 0.6336 (Table 1). Two loci (*Rschu7* and *Rschu11*) deviated
3 significantly from HWE even after Bonferroni correction. Evidence for null alleles was
4 suggested by Micro-Checker for *Rschu11*, which may have arisen from mutations at the
5 annealing site of the primers. *Rschu7* locus displayed a heterozygote excess probably due to a
6 PCR artifact, where one of the alleles was detected with high signal in all samples and a
7 probable pseudo allele that was detected with a minor signal in most samples. But the
8 relatively small sample size could also explain the existence of this departure. Thus, an
9 analysis with larger and different populations may clarify these results for *Rschu7* locus.

10 The identity analysis proved that the combination of loci in equilibrium Hardy-
11 Weinberg enabled an individual discrimination in the 20 specimens. There were no
12 indications of scoring errors attributable to stuttering or large allele dropout at all loci and no
13 significant linkage disequilibrium between loci pairs was detected. Thus, these independent
14 microsatellite loci are suitable for population genetics studies and quantifying reproductive
15 success and relatedness in *R. schneideri*.

16

17 Acknowledgements

18 We are grateful to the São Paulo State Research Foundation (FAPESP) and the
19 Brazilian National Research Council (CNPq) for their financial support. CNPq also supported
20 individual author through grants 152757/2007-4 (ECG). We are grateful to Silvanira Barbosa
21 and Maria do Socorro for their support in the laboratory.

22

1 References

- 2 Bastos RP, Motta JAO, Lima LP, Guimarães LD (2003) *Anfíbios da Floresta Nacional de*
3 *Silvânia*, Goiânia, Goiás, Brazil.
- 4 Brookfield JFY (1996) A simple new method for estimating null allele frequency from
5 heterozygote deficiency. *Molecular Ecology*, **5**, 453–455.
- 6 Castelo AT, Martins W, Gao GR (2002) TROLL – tandem repeat occurrence locator.
7 *Bioinformatics*, **18**, 634–336.
- 8 Cochran DM (1955) Frogs of southeastern Brazil. *US. National Museum Bulletin*, **206**, 1–411.
- 9 Colli GR, Bastos RP, Araújo AFB (2002) The character and dynamics of Cerrado
10 herpetofauna, in the Cerrado of Brazil: *ecology and natural history of a neotropical*
11 *Savanna*, edited by Oliveira PS & Marquis RJ. Columbia University Press, New York.
- 12 Guix JC (1993) Hábitat y alimentación de *Bufo paracnemis* en uma región semiárida del
13 nordeste de Brasil, durante el período de reproducción. *Revista Española Herpetologia*, **7**,
14 65–73.
- 15 Guo SW, Thompson EA (1992) Performing the exact test of Hardy–Weinberg proportion for
16 multiple alleles. *Biometrics*, **48**, 361–372.
- 17 Haddad CFB, Abe AS (1999). *Anfíbios e Répteis*. In: workshop Mata Atlântica e Campos
18 Sulinos.
- 19 Hall TA (1999) Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis
20 program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**, 95–98.
- 21 Kijas JMH, Fowler JCS, Garbett CA, Thomas MR (1994) Enrichment of microsatellites from
22 the citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-
23 coated magnetic particles. *Biotechniques*, **16**, 656–662.

- 1 Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB, Pemberton JM (1998) Statistical confidence for likelihood-
2 based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, **7**, 639–655.
- 3 Oosterhout CV, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER software
4 for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology*
5 *Notes*, **4**, 535–538.
- 6 Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, **43**, 223–225.
- 7 Rousset F (2008) GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software
8 for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, **8**, 103–106.
- 9 Rozen S, Skaletsky HJ (2000) Primer 3 on the www for general users and for biologist
10 programmers. p. 365–386 In S. Krawetz, and S. Misener (Eds.), *Bioinformatics methods*
11 *and protocols: methods in molecular biology*. Totowa: Humana press.
- 12 Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989). *Molecular cloning a laboratory manual*. 2nd
13 edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- 14 Schuelke M (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments.
15 *Nature Biotechnology*, **18**:233–234.
- 16 Silvano DL, Pimenta BVS (2003) Diversidade e distribuição de anfíbios anuros na Mata
17 Atlântica do sul da Bahia. In: Prado PI, Landau EC, Moura RT, Pinto LPS, Fonseca GAB,
18 Alger K (orgs.) *Corredor de Biodiversidade na Mata Atlântica do Sul da Bahia*.
19 Published on CD-ROM, Ilhéus, IESB / CI / CABS / UFMG / UNICAMP.
- 20 Yeh FC, Yang R, Boylet T (1997) *POPGENE Version 1.32: Software Microsoft Window-*
21 *Based Freeware for Population Genetic Analysis*. University of Alberta, Alberta, Canada.
- 22 Whiteley AR, Spruell P, Allendorf FW (2006) Can common species provide valuable
23 information for conservation? *Molecular Ecology*, **35**, 2767–2786.

Table 1: Characteristics of 11 microsatellite loci in *R. schneideri* including, GenBank accession, primer sequences, amplification conditions and polymorphism statistics. All 20 individuals were successfully genotyped in all loci.

GenBank accession	Locus	Primer (5' → 3')	Repeat motif	T _a (°C)	[MgCl ₂] (mM)	Size range without tail (bp)	N _a	H _o	H _e	Null allele frequency	P _{HWE}	PIC
FJ847928	<i>Rschp1</i>	F: *ACACAGGGACAGACAGACAC R: AGAGAGCTGTGAGATGCTGTGAT	(CA) ₈	69°C	0.4	158-166	2	0.25	0.36	0.0732	0.2138	0.2879
FJ847930	<i>Rschp3</i>	F: *GGGCATGGTGATGGTGAC R: TCTGTCCGTCCTCTGTGTC	(CA) ₅ TA(CA) ₉	69°C	1	190-208	6	0.35	0.49	0.0847	0.0651	0.4404
FJ847931	<i>Rschp4</i>	F: *GGCGCAGACCAATCTAAATACT R: GGGCTCAGGACAAAGTAAATGTAA	(AC) ₅ (ACAT) ₃ (AC) ₃ (ACAT) ₄	68°C	1	152-160	2	0.10	0.10	-0.0046	0.9999	0.0905
FJ847933	<i>Rschp6</i>	F: *CCCCACACATGTTGACAGAA R: GCTGTAGGGAATCGTCATCACT	(TACA) ₅	65°C	0.4	131-151	3	0.35	0.35	-0.0084	0.5807	0.3114
FJ847934	<i>Rschp7</i>	F: *AATGCTCTGCTCCCTACT R: CGAGGTGTAATCTGGTGAG	(CA) ₇ AA(CA) ₇	43°C	1	175-181	2	0.85	0.50	-0.2427	0.0017	0.3693
FJ847935	<i>Rschp8</i>	F: *GCACTAGATAAGCCACGAGACAT R: CTGGACCTCTGGTTAAAGTGTGT	(TA) ₆ GG(CA) ₆	70°C	1.5	159-165	3	0.60	0.68	0.0398	0.4722	0.5922
FJ847936	<i>Rschp9</i>	F: *GGTGCATCCAGATCAGATATAGA R: GTAACGCATGCAGTCCAGAG	(CA) ₆ ...(CA) ₇	76°C	1.5	240-248	4	0.55	0.52	-0.0308	0.2260	0.4658
FJ847937	<i>Rschp10</i>	F: *GCAGGGACAGAGACACACAG R: AGTTGGAGCTAGAGTTTGGTGAG	(CA) ₉	70°C	1	159-167	4	0.75	0.71	-0.0332	0.6807	0.6318
FJ847938	<i>Rschp11</i>	F: *TCAGCTGTCTACAGGAAAGGTAAG R: TCGTACACACATCACCACATACA	(GT) ₅ (AT) ₈ CTA(CA) ₇	68°C	1	160-176	4	0.35	0.65	0.1756	0.0004	0.5856
FJ847939	<i>Rschp12</i>	F: *GTTCTAAACCTTCCCGGACAC R: AGCCCTGCGAGTATTGTTTGT	(CA) ₁₈ ...(AT) ₅ ACAC(AT) ₇	67°C	0.6	203-217	4	0.20	0.28	0.0542	0.0521	0.2561
FJ847940	<i>Rschp14</i>	F: *CTGGAGCGCACATTATATACACA R: ATGTTGTTACAGGCGTAGTGTC	(CA) ₉ ...(CA) ₅	69°C	1	119-131	4	0.70	0.65	-0.0067	0.7713	0.6336

F - forward primer, R - reverse primer, * - tail added in forward primer corresponding to the M13 universal sequence 5'- TGTAACACGACGCGCCAGT-3', T_a - annealing

temperature, N_a - number of alleles, H_o - observed heterozygosity, H_e - expected heterozygosity, P_{HWE} - probability of deviation from Hardy-Weinberg equilibrium after

Bonferroni corrections comparisons ($P < 0.0045$), significant values are in bold, PIC - polymorphic information content.

4.2 ARTIGO 5

Conservation Genet Resour
DOI 10.1007/s12686-010-9172-y

TECHNICAL NOTE

Development of eleven polymorphic microsatellite markers for the Chaco Treefrog, *Hypsiboas raniceps*

Maurício P. Arruda · Evonnildo C. Gonçalves ·
Artur Silva · Maria Paula C. Schneider ·
Eliana Morielle-Versute

Received: 9 December 2009 / Accepted: 1 January 2010
© Springer Science+Business Media B.V. 2010

Abstract We report the characterization of eleven polymorphic microsatellite loci for *Hypsiboas raniceps* in 20 individuals collected in the northwest of São Paulo State, Brazil. The number of alleles per locus, observed heterozygosity and polymorphic information content ranged from 2 to 16, 0.05 to 0.90 and 0.048 to 0.905, respectively. Linkage equilibrium was observed for all loci and only one locus showed significant deviation from Hardy–Weinberg equilibrium with evidence of null alleles. The remaining ten loci will be useful for population genetic studies and revealing population structure in this species.

Keywords *Hypsiboas raniceps* · Hylidae · Microsatellite · Population genetic

The Chaco Treefrog, *Hypsiboas raniceps* is an arboreal frog species widespread in the Amazon (Brazil, Colombia, Venezuela and French Guiana), eastern Brazil and Bolivia reaching the Argentine and Paraguayan Chaco. *H. raniceps* is classified as “least concern” by IUCN (La Marca et al. 2004) due to its wide distribution and presumed large population. However, as many of its natural habitats have

been lost due to human activities such as agriculture, fire, and development of infrastructure, *H. raniceps* became a potentially informative species for studies of population decline in areas with anthropogenic pressures. Thus, we developed a set of polymorphic microsatellite loci and characterized its useful in the investigation of natural populations by estimating the genetic diversity and levels of reproductive success, providing new perspectives for the conservation of endangered populations of *H. raniceps*.

Two enriched libraries for microsatellites type (CA)_n/(GT)_n and (CT)_n/(GA)_n were constructed following the modified protocol of Kijas et al. (1994). Genomic DNA was isolated from muscle tissue from an adult collected. DNA was extracted using standard protocol according Sambrook et al. (1989). Ten micrograms of genomic DNA were digested with Sau3AI and fragments of 300–1,000 bp were selected, purified using a Illustra™ GFX PCR and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) and ligated to Sau3AI adapters (AdapF/AdapR) using T4 DNA ligase. The DNA fragments were amplified by polymerase chain reaction (PCR) with a limited number of cycles (18 cycles) to minimize redundant clones in the libraries using AdapF as primer. The PCR product was purified, denatured and then hybridized to biotinylated (CA)₁₅ and (CT)₁₂ probes at 55°C for 5 h and fragments containing microsatellite repeats were captured using streptavidin-coated magnetic beads (Dynal). The enriched single strand DNA was eluted in 100 µL of TE buffer, amplified through PCR to recover double-stranded fragments, ligated into pGEM-T Easy Vector (Promega), desalinated and transfected into TOP 10 electrocompetent *Escherichia coli* (Invitrogen). After growth in solid 2XYT/Ampicilina/X-gal, 288 clones of each library were bi-directionally sequenced using MegaBACE™ 1000 DNA Analysis System (GE Healthcare). Troll (Castelo et al. 2002) was used to screen clones

M. P. Arruda (✉) · E. Morielle-Versute
Departamento de Zoologia e Botânica, Instituto de Biociências,
Letras e Ciências Exatas (IBILCE), Laboratório de Chiroptera,
Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rua Cristóvão
Colombo, 2265 Jardim Nazareth, CEP 15061-000 São José do
Rio Preto, SP, Brazil
e-mail: arrudabio@gmail.com

E. C. Gonçalves · A. Silva · M. P. C. Schneider
Laboratório de Polimorfismo de DNA, Instituto de Ciências
Biológicas, UFPA, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará,
Brazil

Table 1 Description of 16 microsatellite loci in *H. romicaps* including, GenBank accession, primer sequences, amplification conditions and polymorphism statistics

GenBank accession	Locus	Primer (5'→3')	Repeat motif	T _a (°C)	[MgCl ₂] (mM)	Size range without tail (bp)	N _a	H _o	H _e	Estimated null allele frequency	P _{fix}	PIC
GU295110	<i>Hranipl1</i>	F: *GCACCTCATGACACAACT R: CTGCTGCAGGATACAAAGGAC	(CA) ₆ TA(CA) ₆ AA (CA) ₅	61°C	3	261–271	3	0.10	0.54	0.2781	0.0000	0.4103
GU295111	<i>Hranipl2</i>	F: *GAGCGGTGCCAGGTAGTAGT R: CAAGGTAGGCGTGTGTGTGT	(AC) ₅ (CA) ₆	67°C	1.5	96–100	2	0.45	0.45	–0.0078	0.9999	0.3425
GU295112	<i>Hranipl3</i>	F: *AGGTACACACACTCCACATC R: GCCGCTGCCCAACTATG	(CA) ₈	68°C	1	203–211	3	0.55	0.56	–0.0032	0.9999	0.4415
GU295113	<i>Hranipl4</i>	F: *GAGCACACCATATACACAGAC R: CAGCTTGTACAGCATAGAGATTGTC	(CA) ₉	65°C	2	194–214	8	0.65	0.71	0.0229	0.9246	0.6373
GU295114	<i>Hranipl5</i>	F: *AGGGTTCCTTACAGGT R: AGGTACAATCAAGCCACAACATA	(CA) ₅ ...(CA) ₈	60°C	0.6	173–177	2	0.55	0.41	–0.1081	0.2560	0.3192
GU295115	<i>Hranipl6</i>	F: *CTTGGGACTCCTTATGCTGTG R: AGGTGACAGAAAGGTGGAATC	(CA) ₁₇	53°C	0.8	143–165	7	0.75	0.80	0.0148	0.7935	0.7426
GU295116	<i>Hranipl7</i>	F: *AGCGTGTGAGTTTCAGGTG R: TCAGAAAGGAAGTTGCAGAGG	(CA) ₁₈ (CATA) ₅	61°C	1	253–291	15	0.80	0.93	0.0557	0.1779	0.8987
GU295117	<i>Hranipl8</i>	F: *CACACCCCATCCACATACAA R: GGCCAGGAGGTGAGACTG	(AC) ₆ ...(AC) ₈	63°C	0.6	192	1	–	–	–	–	–
GU295118	<i>Hranipl9</i>	F: *AGGTAAGTACCGAGCATCAGAC R: CAGGGAGTGTCTGTGTGTGT	(CA) ₆ ...(CA) ₆	62°C	1	142	1	–	–	–	–	–
GU295119	<i>Hranipl10</i>	F: *TCTCTCTCTCTGTGTCTCTTC R: GTACAGTCATGTCACAGCGTT	(GT) ₁₁ (CT) ₆ GTAT(CT) ₈ ...(CT) ₁₀	53°C	2.5	239–277	12	0.76	0.88	0.0503	0.1135	0.8433
GU295120	<i>Hranipl11</i>	F: *GTGCCCTGCCATCATCAC R: CGCAAAATCTTGGGCTGTCT	(TCTA) ₈ TCTCA (TATC) ₅ (TCTA) ₁₁ ...	55°C	1.5	350–442	16	0.90	0.93	0.0059	0.0939	0.9048
GU295121	<i>Hranipl12</i>	F: *CCCTCTTGTCTCACGTTTC R: AGAGCAAGCGAGAGAGTGC	(CT) ₉	63°C	0.8	277	1	–	–	–	–	–
GU295122	<i>Hranipl13</i>	F: *TCTCTGCTCTTCTCTGGTCTC R: CACTGCTGACTCTGGAGGA	(TC) ₈ ...(TC) ₈	70°C	3	214–222	4	0.20	0.23	0.0234	0.2460	0.2201
GU295123	<i>Hranipl14</i>	F: *CAGAGCGGGACAGTTAGTAGT R: AGAAGTCTATGGAGCCGAGTA	(CA) ₅ (AC) ₅ ...(CA) ₉	70°C	2.5	226	1	–	–	–	–	–
GU295124	<i>Hranipl15</i>	F: *ATGACAGGTCACGGCAGAA R: GTGTTAACGAGCAGTTGGACAG	(TA) ₇	69°C	2	125	1	–	–	–	–	–

Table 1 continued

GenBank accession	Locus	Primer (5'→3')	Repeat motif	T_a (°C)	[MgCl ₂] (mM)	Size range without tail (bp)	N_a	H_o	H_e	Estimated null allele frequency	P_{HWE}	PIC
GU295125	<i>Hraniμ16</i>	F: *AGTAACCTCTGTGACCCAGCAC R: CAGATATGGGGTATGCCTGGT	(GCA) ₅	67°C	1	96–105	2	0.05	0.05	–0.0012	0.9999	0.0476

All individuals were genotyped in all loci, except in *Hraniμ10* with 17 individuals successfully genotyped

F, forward primer; R, reverse primer; *, tail added in forward primer corresponding to the M13 universal sequence 5'-TGTAACACGACGGCCAGT-3'; T_a , annealing temperature; N_a , number of alleles; H_o , observed heterozygosity; H_e , expected heterozygosity; P_{HWE} , probability of deviation from Hardy–Weinberg equilibrium after Bonferroni corrections comparisons ($P < 0.0045$); significant values are in bold; PIC, polymorphic information content

rich in microsatellites and those containing a greater number of repeats, were aligned using BioEdit (Hall 1999) to identify and exclude redundant clones. After removal of vector and adapters regions, primers were designed to 16 different sequences using Primer 3 (Rozen and Skaletsky 2000). M13-tail was added in 5' end of the each forward primer of the identical sequence to labeled universal primer with Cy5 and the PCR reaction was carried using method described by Arruda et al. (2009). The primer sets were used to screen 20 individuals from Votuporanga (20°30'S, 50°5'O) in the northwest of São Paulo, Brazil. PCRs were prepared in a final volume of 15 μ L with 25 ng template DNA, 1 \times PCR buffer, 0.2 mM of each dNTP, 0.6–3 mM MgCl₂ (Table 1), 0.6 pmol of each primer (forward and reverse) and one unit of Platinum[®] Taq DNA Polymerase (Invitrogen). PCR profile for all loci was: 5 min at 94°C followed by 40 cycles of 30 s at 94°C, 45 s at specific annealing temperature (Table 1), and 45 s at 72°C. After this, PCRs were stopped and 1 pmol of the Cy5-labeled M13 universal primer was added to each reaction and then PCRs were subjected to new profile, consisting of 30 s at 94°C, 45 s at 53°C, 45 s 72°C and a final extension of 30 min at 72°C. PCR products were run on 6% denaturing polyacrylamide gels using an ALFexpress II automatic DNA processor and alleles were scored through Allele Locator 1.03 (Amersham Biosciences).

Microsatellites were quantified in terms of the number of alleles per locus, observed and expected heterozygosity using Popgene 32 (Yeh et al. 1997). Genepop 4.0.9 (Rousset 2008) was used to analyze heterozygote excess and deficiency, linkage disequilibrium in locus-pair comparisons and deviations from Hardy–Weinberg expectations. Significance probabilities were calculated by the Markov chain method (Guo and Thompson 1992), with 10,000 dememorization steps and 100 batches of 5,000 iterations per batch as implemented in GenePop 4.0.9. Power of individual discrimination (identity analysis) and polymorphic information content were performed using Cervus 3.0.3 (Marshall et al. 1998). All levels of significance were corrected for multiple tests (Rice 1989). Finally, we used Micro-Checker 2.2.3 (Oosterhout et al. 2004) to test for null alleles in the data calculated following Brookfield (1996) and genotyping errors at each locus.

Of the total number of clones sequenced and exported to TROLL software, 57% were rich in single sequence repeats (SSRs). The probe (CA)₁₅ showed greater efficiency than (CT)₁₂ to isolate microsatellites from *H. raniceps* genome (76 and 41%, respectively). Five loci (*Hraniμ8*, *Hraniμ9*, *Hraniμ12*, *Hraniμ14* and *Hraniμ15*—Table 1) were monomorphic while eleven loci were polymorphic, which number of alleles per locus, observed heterozygosity and polymorphic information content ranged from 2 to 16, 0.05

to 0.90 and 0.048 to 0.905, respectively (Table 1). No evidence of linkage disequilibrium between pairs of loci was detected, however one locus (*Hranip1*) significantly departure from Hardy–Weinberg equilibrium even after Bonferroni can be explained by the presence of null alleles suggested by Micro-Checker. An identity analysis indicated that combined 10 remain loci in Hardy–Weinberg equilibrium are suitable to individual discrimination. Furthermore, no indication of genotyping errors attributable to stutter bands or large allele dropout was verified. Therefore, the microsatellite markers developed and optimized in the present study offer a powerful tool for population genetic studies in *H. raniceps*.

Acknowledgments We are grateful to the São Paulo State Research Foundation (FAPESP) and the Brazilian National Research Council (CNPq) for their financial support. CNPq also supported individual author through grants 152757/2007-4 (ECG).

References

- Arruda MP, Gonçalves EC, Schneider MPC, Silva ALC, Morielle-Versute E (2009) An alternative genotyping method using dye-labeled universal primer to reduce unspecific amplifications. *Mol Biol Rep* DOI 10.1007/s11033-009-9655-7
- Brookfield JFY (1996) A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Mol Ecol* 5:453–455
- Castelo AT, Martins W, Gao GR (2002) TROLL—tandem repeat occurrence locator. *Bioinformatics* 18:634–636
- Guo SW, Thompson EA (1992) Performing the exact test of Hardy–Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48:361–372
- Hall TA (1999) Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acid S* 41:95–98
- Kijas JMH, Fowler JCS, Garbett CA, Thomas MR (1994) Enrichment of microsatellites from the citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles. *Biotechniques* 16:656–662
- La Marca E, Azevedo-Ramos C, Silvano D, Scott N, Aquino L, Faivovich J (2004). *Hypsiboas raniceps*. In: IUCN 2009. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2009.1. www.iucnredlist.org. Downloaded on 04 December 2009
- Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB, Pemberton JM (1998) Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol Ecol* 7:639–655
- Oosterhout CV, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4:535–538
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43:223–225
- Rousset F (2008) GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resour* 8:103–106
- Rozen S, Skaletsky HJ (2000) Primer 3 on the www for general users and for biologist programmers 365–386. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology*. Humana press, Totowa
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Yeh FC, Yang R, Boylet T (1997) POPGENE Version 1.32: Software Microsoft window-based freeware for population genetic analysis. University of Alberta, Alberta

4.3 ARTIGO 6

*Twelve polymorphic microsatellite loci developed and optimized from the *Leptodactylus chaquensis**

Running Head: SSR loci in the frog species *Leptodactylus chaquensis*

Maurício P. ARRUDA¹, Eliana MORIELLE-VERSUTE¹, Artur SILVA², Maria Paula Cruz SCHNEIDER², and Evonnildo C. GONÇALVES²

¹Laboratório de Chiroptera, Departamento de Zoologia e Botânica, UNESP - Universidade Estadual Paulista – Campus de São José do Rio Preto.

²Laboratório de Polimorfismo de DNA, Instituto de Ciências Biológicas, UFPA - Universidade Federal do Pará.

Abstract

We isolated and characterized twelve polymorphic microsatellite loci for *Leptodactylus chaquensis*. Levels of polymorphism of the microsatellite loci measured in twenty individuals showed two to 7 alleles per locus with observed heterozygosity ranging from 0.20 to 0.75 and polymorphic information content ranging from 0.1736 to 0.7431. No evidence for linkage disequilibrium was detected between all pairs of loci and deviations from Hardy-Weinberg expectations were not significant for any loci. These microsatellite markers reported here can be used in genetic analysis of populations and contribute to a better understanding of the taxonomy of the *ocellatus* group verifying the occurrence of reproductive isolation of species (or subspecies) closely related to *L. chaquensis*.

Key Words: *Leptodactylus*, Leptodactylidae, microsatellite, *ocellatus* group, population genetics

The frog *Leptodactylus chaquensis* belongs to the *ocellatus* group that is the least diverse in *Leptodactylus*, with only six species which deposit eggs in foam nests on the surface of water (Prado and Haddad 2003). However, some species included in

this group are morphologically indistinguishable (e.g. *L. chaquensis* – *L. macrosternum*; De la Riva and Maldonado, 1999) and live in sympatry causing taxonomic uncertainty about the complexity of this group (and species). It is distributed in northern Argentina and Uruguay, eastern Bolivia, Paraguay and portions of northwest (state of Acre), mid-western (Mato Grosso do Sul), southeastern (São Paulo and Minas Gerais), and southern Brazil (Rio Grande do Sul) (Vasconcelos and Rossa-Feres 2005; Santos and Cechin 2008), associated with Caatinga-Cerrado-Chaco e Pampa biomes (Duellman 1999). Although it is most common (Least Concern - IUCN), some populations are threatened (Maneyro and Langone 2001) due to persecution for consumption (Heyer et al. 2004).

Here, we isolated and optimized informative microsatellite loci for population analysis of *L. chaquensis* and can contribute to clarify some outstanding taxonomic issues in the *ocellatus* group, testing reproductive isolation and hybridization between the species included in this group.

Twelve polymorphic microsatellite loci were developed from two partial genomic libraries enriched for CA_n and CT_n repeats following modified procedure of Kijas et al. (1994). Genomic DNA was extracted using a standard protocol according to Sambrook et al. (1989), from muscle tissue samples obtained of two adult individuals. Ten micrograms of genomic DNA was digested with *Sau3AI* and the 300-1000 bp size fraction were purified using a illustra™ GFX PCR and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) and ligated to *Sau3AI* adaptors (AdapF/AdapR) using T4 DNA ligase. The DNA fragments were amplified by polymerase chain reaction (PCR) with a limited number of cycles (18 cycles) to avoid redundant clones in the libraries using AdapF as primer. The PCR product was purified, denatured and then hybridized to biotinylated (CA₁₅ and CT₁₂) probes at 55°C for 5h and fragments containing microsatellite repeats were captured using streptavidin-coated magnetic beads (Dynal). The sample was eluted in 100 µL TE buffer, and a PCR using AdapF primer was conducted to make fragments double-stranded. PCR products were ligated into pGEM-T Easy Vector (Promega) overnight and then desalted before electroporation into *Escherichia coli* TOP 10 (Invitrogen). We plated cells on 2XYT-agar/Ampicilin/X-gal and after incubation to 37°C for 14 hours; white colonies were transferred for 96-Well plates with highly enriched medium Tartoff-Hobbs Broth/Ampicilin and again grown to 37°C for 6 hours. The libraries were glycerolized and stored at -20°C.

A total of 288 clones were sequenced (192 from CA_n/GT_n library and 96 from CT_n/GA_n library) on MegaBACE™ 1000 DNA Analysis System (GE Healthcare) using DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit. Sequences were analyzed using Troll software (Castelo et al. 2002) finding 172 clones containing microsatellites (with four or more repetitions). CA₁₅ probe had a better efficiency in the number microsatellite captured (73% vs. 55%) over the CT₁₂ probe. The microsatellite containing the longest repetitions have been edited (removing the vector and adapter) in BioEdit software (Hall 1999) and selected to design primers from flanking regions of repeats using the Primer 3 software (Rozen and Skaletsky 2000). M13-tail was added in 5' end of the each forward primer of the identical sequence to labeled universal primer with Cy5 and the PCR reaction was carried using method described by Arruda et al. (2010).

The polymorphism of loci was assessed with samples from twenty adult individuals collect in one locality (municipally of Macaubal - 20°44'44.34"S and 49°56'17.64"O) of Northwest of São Paulo State, Brazil. PCRs were prepared in a final volume of 15 µL containing 25 ng template DNA, 1X PCR buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl), 0.2 mM of each dNTP, 0.8-4 mM MgCl₂ (Table 1), 0.6 pmol of each primer (forward and reverse) and one unit of Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen). All PCRs were performed under the following conditions: 94 °C for 5 min followed by 40 cycles of 30 s at 94 °C, 45 s at specific annealing temperature (Table 1), and 45 s at 72 °C. After this, PCRs were stopped and 1 pmol of the Cy5-labeled M13 universal primer was added to each reaction and then PCRs were subjected to new profile, consisting of 30 s at 94 °C, 45 s at 53 °C, 45 s 72 °C and a final extension of 30 min at 72 °C. PCR products were analyzed on an automatic sequencer ALFexpress™ II (Amersham Biosciences) and size of alleles was determined by the program Allele Locator 1.03 (Amersham Biosciences) using external size standard (50-500 pb) and internal size standard suitable for different individual locus.

The number of alleles per locus and observed and expected heterozygosity were calculated using Popgene 1.32 (Yeh et al. 1997). Loci were examined for heterozygote excess and deficiency, deviation from Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) and linkage disequilibrium using the GenePop 4.0.9 software package (Rousset 2008). Significance probabilities were calculated by the Markov chain method (Guo and Thompson 1992), with 10.000 dememorization steps and 100

batches of 5.000 iterations per batch as implemented in GenePop 4.0.9. The individual discriminating power (identity analysis) and polymorphic information content were performed using Cervus 3.0.3 (Marshall et al. 1998). The sequential Bonferroni correction was applied to adjust the level of significance for multiple comparisons (Rice 1989). We used Micro-Checker 2.2.3 (Oosterhout et al. 2004) to check microsatellite data for null alleles calculated following Brookfield (1996) and genotyping errors at each locus.

The set of 14 microsatellites evaluated here, only two were monomorphic (*Lchaqu*11 and *Lchaqu*12 – Table 1). The twelve polymorphic microsatellites were isolated and produced of 2 to 7 alleles, observed heterozygosities of 0.20 to 0.75 and polymorphic information content ranged from 0.1736 to 0.7431. The individual discriminating power of 20 individuals using the combination of loci (identity analysis) was confirmed. We did not detect significant linkage disequilibrium between pairs of loci and any deviation from Hardy-Weinberg equilibrium. Furthermore, no indication of genotyping error attributable to stutter bands and/or large allele dropout was observed.

Acknowledgements

We are grateful to the São Paulo State Research Foundation (FAPESP) and the Brazilian National Research Council (CNPq) for their financial support. CNPq also supported individual author through grants 152757/2007-4 (ECG).

References

- Arruda MP, Gonçalves EC, Schneider MPC, Silva ALC, Morielle-Versute E (2010) An alternative genotyping method using dye-labeled universal primer to reduce unspecific amplifications. *Mol Biol Rep* 37:2031-2036
- Brookfield JFY (1996) A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Mol Ecol* 5:453-455
- Castelo AT, Martins W, Gao GR (2002) TROLL – tandem repeat occurrence locator. *Bioinformatics* 18:634-336
- De la Riva I, Maldonado M (1999) First record of *Leptodactylus ocellatus* (Linnaeus, 1758) (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) in Bolivia and comments on related species. *Graellsia* 55:193-197

- Duellman, WE (1999) Distribution patterns of amphibians in South America; 255-328
In WE Duellman (ed.). Patterns of distribution of amphibians: A global perspective. Baltimore and London: The Hopkins University Press
- Guo SW, Thompson EA (1992) Performing the exact test of Hardy–Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48:361-372
- Hall TA (1999) Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acid S* 41:95-98
- Heyer R, Reichle S, Silvano D, Lavilla E, Tada I (2004). *Leptodactylus chaquensis*. In: IUCN 2009. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2009.1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 07 October 2009
- Kijas JMH, Fowler JCS, Garbett CA, Thomas MR (1994) Enrichment of microsatellites from the citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles. *Biotechniques* 16:656-662
- Maneyro R, Langone JA (2001) Categorización de los anfibios del Uruguay. *Cuadernos de Herpetología* 15(2):107-118
- Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB, Pemberton JM (1998) Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol Ecol* 7:639-655
- Oosterhout CV, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4:535-538
- Prado CPA, Haddad CFB (2003) Testes size in leptodactylid frogs and occurrence of multile spawning in the genus *Leptodactylus* in Brazil. *Journal Herpetol* 37(2):126-134
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43:223-225
- Rousset F (2008) GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resour* 8:103-106
- Rozen S, Skaletsky HJ (2000) Primer 3 on the www for general users and for biologist programmers 365-386 In S. Krawetz, and S. Misener (Eds.), *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology*. Totowa: Humana press
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). *Molecular cloning a laboratory manual*. 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

- Santos TG, Cechin SZ (2008). Amphibia, Anura, Leptodactylidae, *Leptodactylus chaquensis*: Distribution extension in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. Check List 4(2):142-144
- Vasconcelos TS, Rossa-Feres DC (2005) Diversidade, distribuição espacial e temporal de anfíbios anuros (Amphibia, Anura) na região noroeste do estado de São Paulo, Brasil. Biota Neotrop 5(2):1-14
- Yeh FC, Yang R, Boyle T (1997) POPGENE Version 1.32: Software Microsoft Window-Based Freeware for Population Genetic Analysis. University of Alberta, Alberta, Canada

Table 1: Microsatellite loci isolated and characterized from the *L. chaquensis*. The twenty individuals were genotyped at all loci, the exception of loci 10 and 15 with 17 and 19 successfully genotyped individuals, respectively.

GenBank accession	Loci	Primer (5' → 3')	Repeat motif in library	T _a (°C)	[MgCl ₂] (mM)	Size range without tail (bp)	N _a	Ho	He	Estimated null allele frequency	P _{HWE}	PIC
GU591313	<i>Lchaqu1</i>	F: *CTTGGATGGTCAGGCAGTTC R: CAAGGGCAAGCTGGATATG	(CA) ₁₀	65	1.5	224-242	6	0.55	0.66	0.0642	0.0170	0.6160
GU591314	<i>Lchaqu4</i>	F: *GCAGAAATGTGAACCCCTAAACC R: CCAAGGTGAGTGTAAGGTGTGTGT	(CA) ₅ (TTA) ₇	58	3	239-275	5	0.30	0.38	0.0545	0.2597	0.3456
GU591315	<i>Lchaqu5</i>	F: *GGGGATAAAACACCCGTTCT R: GGCCTGACCCATCCAGTA	(CA) ₁₉	43	0.8	180-210	7	0.75	0.79	0.0141	0.7228	0.7431
GU591316	<i>Lchaqu6</i>	F: *ACACCACCATACAGGTACACACAC R: GCCGCTGCCACAACTATG	(CA) ₈ ...(CA) ₅	53	4	229-243	5	0.60	0.55	-0.0398	0.8712	0.5051
GU591317	<i>Lchaqu7</i>	F: *ACAGCAACGCATCCTTTTCAG R: GTGAGTCGGTCGGTCTATCTGT	(GCACAC) ₈	70	1.5	64-88	3	0.45	0.54	0.0484	0.4969	0.4103
GU591318	<i>Lchaqu8</i>	F: *AGCACCCGACAGGAACACA R: GGCTCGGACGCTGTCTATCT	(CA) ₇ ...(CA) ₅	43	2.5	247-263	5	0.65	0.63	-0.0193	0.9355	0.5689
GU591319	<i>Lchaqu9</i>	F: *TCACATCACATCACGTCACATC R: CCTTACGCTTGGACCTCTGAT	(TCACA) ₃₄	45	4	190-195	2	0.30	0.51	0.1304	0.0855	0.3725
GU591320	<i>Lchaqu10</i>	F: *CACACACCACTAACATACATAC R: ATGTCTACTACCCACAGTTACA	(CA) ₇	48	4	99-117	6	0.65	0.80	0.0371	0.2007	0.7344
GU591321	<i>Lchaqu11</i>	F: *ACGTAAATGATATACACCCACA R: GATCTGATAGCAATGACTTAACATT	(CA) ₅ (TA) ₂ C(AT) ₆	58	0.8	140	1	-	-	-	-	-
GU591322	<i>Lchaqu12</i>	F: *GGACACATCAGCAGCAACAGTA R: TGTGCTGGCGACAGAAAG	(CAT) ₃ (CAG) ₇	50	3	137	1	-	-	-	-	-
GU591323	<i>Lchaqu13</i>	F: *AGACACACACAGCTCTGCTACA R: GAGTGAGGCTCTGACTGCTCT	(CA) ₁₆	53	2.5	100-110	4	0.60	0.53	-0.0552	0.8769	0.4634
GU591324	<i>Lchaqu14</i>	F: *ACACAGTGCAACGGCAATAG R: CTGTGATTTATGGGGCCGTAG	(TTTA) ₄	65	2.5	165-181	3	0.20	0.19	-0.0137	0.9999	0.1736
GU591325	<i>Lchaqu15</i>	F: *CTTCCAGATTTTCCCAAT R: TATGGCTAAGGGTCTACATGGT	(ATT) ₅	50	4	160-172	4	0.42	0.45	0.0116	0.0381	0.3795
GU591326	<i>Lchaqu16</i>	F: *ATGTACACAGGCACATGCAAA R: AGCATGAGGCTGAGCTGATATAC	(CA) ₆ ...(AT) ₅	65	3	178-196	4	0.55	0.61	0.0282	0.7155	0.5307

F - forward primer, R - reverse primer, * - tail added in forward primer corresponding to the M13 universal sequence 5'- TGTAACACGACGGCCAGT-3', T_a - annealing temperature, N_a - number of alleles, Ho - observed heterozygosity, He - expected heterozygosity

5 DISCUSSÃO GERAL

5.1 DESENVOLVIMENTO DOS MICROSSATÉLITES

As seis bibliotecas enriquecidas em microssatélites construídas para as três espécies (três bibliotecas CA_n/GT_n e três bibliotecas CT_n/GA_n) geraram 3.456 clones recombinantes. Do total produzido, 1.344 (39%) foram submetidos ao sequenciamento para identificação dos insertos contendo microssatélites; desse conjunto, 229 clones apresentaram baixa confiabilidade ou ausência de reação de sequenciamento, logo foram excluídos das análises.

Dos 1.115 clones selecionados para a análise no aplicativo Troll (CASTELO et al., 2002), visando a varredura por insertos contendo microssatélites, 63% apresentaram microssatélites na média das três espécies, enquanto que o restante das sequências (37%) não continha regiões repetidas ou eram desprovidas das características previamente estabelecidas, como tamanho mínimo da repetição (motivos repetidos por no mínimo três vezes e tamanho mínimo de 10 bases da sequência de microssatélite), e foram suprimidos do estudo.

A estratégia de hibridização seletiva empregada na construção das bibliotecas genômicas apresentou alta eficiência na captura dos microssatélites, quando comparada com o mesmo método utilizado em estudos com outros vertebrados como: 11% em peixe bodiã-de-pinta (ARIGONI; LARGIADÉR, 2000), 11% em jacaré-de-papo-amarelo (ZUCOLOTO et al., 2003) e 20% em tamanduá-bandeira (GARCIA et al., 2005). A eficácia das bibliotecas produzidas foi similar à de outros estudos realizados com espécies de anfíbios e que utilizaram igualmente a técnica de hibridização seletiva, como os de Chan (2007a; b) que aplicou sondas di-, tri- e tetranucleotídicas e obteve uma eficiência de 40% em *Scaphiopus couchii* (Scaphiropodidae) e 42% em *Bufo cognatus* (Bufonidae). De forma semelhante, Pröhl et al. (2002) verificaram 40% de regiões contendo microssatélites nas bibliotecas construídas em *Phrylaemus pustulosus* (Leptodactylidae). Simandle et al. (2006) conseguiram um aproveitamento superior, submetendo o DNA de *Bufo boreas* a um coquetel em enzimas de restrição, antes do processo de hibridização, e capturaram 75% (AAT_n/TTA_n) e 80% (TAGA_n/ATCT_n) de regiões ricas em microssatélites.

A eficiência na obtenção dos microssatélites está correlacionada com diversos fatores como: tipo de enzima, sonda escolhida, espécie alvo, condições do procedimento e mesmo no processo utilizado para caracterização dos microssatélites. De acordo com dados da literatura, a maioria dos microssatélites

isolados (30-67%) é composta de repetições dinucleotídicas (TÓTH et al., 2000), seguido por mono- e tetranucleotídicas, e as repetições tri- penta- e hexanucleotídicas são menos dominantes (ELLEGREN, 2004).

A exceção das plantas, a densidade de microssatélites está correlacionada positivamente com o tamanho do genoma (HANCOCK, 1996; KATTI et al., 2001; GARNER, 2002). Portanto, destacamos que a alta eficácia obtida no presente estudo, bem como nas bibliotecas de anfíbios em geral, deve-se preponderantemente a abundância maior de microssatélites no genoma de anfíbios, bem como a escolha de sondas apropriadas.

No conjunto dos clones analisados nas bibliotecas CA_n/GT_n , 76% continham regiões microssatélites, enquanto que nos clones analisados nas bibliotecas do tipo CT_n/GA_n , 44% foram ricos em microssatélite, com esse padrão sendo uniforme para as três espécies. Esses dados refletem uma eficiência 32% superior da sonda CA_{15} na captura de microssatélites em relação à sonda CT_{12} e, são corroborados por outros estudos que confirmam a maior abundância de motivos CA no genoma de eucariotos (TÓTH et al., 2000). Semelhantemente, Pröhl et al. (2002) detectaram em *P. pustulosus* (Leptodactylidae – Amphibia) um maior aproveitamento na captura de microssatélites pela sonda CA (64%) em relação à sonda CT (9%).

Os trabalhos de literatura revelam haver uma baixa relação de microssatélites isolados e aqueles disponíveis para o desenho dos iniciadores, devido a fatores como escolha das enzimas de restrição, baixa qualidade das sequências (HAMILTON; FLEISCHER, 1999), proximidade do microssatélite ao sítio de clonagem inviabilizando a confecção dos oligos, bem como redundância dos clones. Entretanto, no atual estudo, o principal fator limitador para o desenho dos iniciadores foi a baixa quantidade de microssatélites com um número grande de repetições (12% em média). Da mesma forma, Rogell et al. (2005) sequenciaram 197 clones de bibliotecas CA_n/GT_n e CT_n/GA_n na espécie *Bufo calamita*, e visualizaram 21 sequências longas repetidas (10%).

Nos estudos populacionais é necessária a escolha de marcadores polimórficos que permitam o acesso a variabilidade genética populacional. A taxa mutacional dos microssatélites é influenciada por multifatores, mas o principal está relacionado à quantidade de unidades de repetição por *locus*, baseado na premissa de que microssatélites extensos sofrem mais mutações do que *loci* curtos (BRANDSTROM; ELLEGREN, 2008). Isto pode ser explicado pelo fato de que a

quantidade maior de unidades de repetição fornece mais oportunidades para o pareamento incorreto e deslizamento da polimerase (ELLEGREN, 2004). Assim, os microssatélites longos são preferíveis para o desenho dos iniciadores.

Das sequências selecionadas para a confecção dos iniciadores, as compostas por dinucleotídeos apresentaram um número maior de unidades repetidas, e esses, portanto foram os motivos prevalentes no desenho dos iniciadores. Ellegren (2000) detectou no genoma humano que contrações e expansões são igualmente comuns em motivos tetranucleotídeos, enquanto que a expansão é o evento mais comum em dinucleotídeos. Isso fornece uma explicação para a presença de dinucleotídeos mais longos. O fator promotor dessa diferença não é bem estabelecido, mas pensando em eventos de deslizamento, por razões estruturais da dupla hélice, a formação de *hairpin* para eliminação de uma unidade dinucleotídica é menos provável do que para um tetranucleotídeo. Isso pode explicar a predominância de dinucleotídeos e mononucleotídeos numerosos e extensos no genoma das espécies em detrimento das classes maiores de motivos (TEMNYKH et al., 2001; GROVER; SHARMA, 2007), com algumas exceções (SHARMA et al., 2007). No genoma humano, por exemplo, estima-se que existam poucos milhares de *locus* com repetições pentanucleotídicas, ao passo que existem cerca de meio milhão de *locus* de repetições mononucleotídicas (BENNETT, 2000).

No total foram confeccionados 94 iniciadores para amplificação de 47 *loci* microssatélites nas três espécies de acordo com a seguinte distribuição: 15 *loci* em *R. schneideri*, 16 em *L. chaquensis* e 16 em *H. raniceps*. As sequências completas dos microssatélites selecionados estão exibidas no Apêndice 1.

Para determinação dos genótipos, desenvolvemos um método de genotipagem modificado baseado na utilização de iniciador marcado (ARRUDA et al., 2010), que foi hábil na amplificação de 43 *loci* (91% de sucesso). Após as otimizações de cada *locus* em termos de temperatura de anelamento e concentração de $MgCl_2$, os produtos da PCR exibiram padrão desejável para genotipagem, ou seja, com alta porção de DNA nos amplicons (referentes às regiões alvos) e poucas amplificações inespecíficas, bandas *stutter*, sujeiras e ruído. Essa qualidade dos produtos das PCRs (dados dos genótipos) foi confirmada pelo Micro-Checker 2.2.3 (OOSTERHOUT et al., 2004) que não indicou *stuttering* ou amplificação preferencial de alelos curtos.

Do conjunto total de microssatélites avaliados, apenas 9 foram monomórficos (*Rschμ2* e *Rschμ5* em *R. schneideri*; *Hraniμ8*, *Hraniμ9*, *Hraniμ12*, *Hraniμ14*, *Hraniμ15* em *H. raniceps* e *Lchaμ11*, *Lchaμ12* em *L. chaquensis*). Dos microssatélites polimórficos obtidos, somente três exibiram desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg (*Rschμ7*, *Rschμ11* e *Hraniμ1*) devido à presença de alelos nulos ou pseudo-alelos.

Ao final, foram isolados 9 *loci* microssatélites em *R. schneideri*, 10 em *H. raniceps* e 12 em *L. chaquensis*, que estão em equilíbrio de ligação e conforme as expectativas de Hardy-Weinberg e portanto, convenientes para estudos populacionais demográficos nestas espécies.

5.2 ANÁLISES POPULACIONAIS

As fragmentações promovidas pela ocupação humana são apontadas como fatores locais e globais no declínio dos anfíbios, particionando o hábitat natural em fragmentos discretos, minimizando a conectividade entre as populações (WILCOX; MURPHU, 1985; BENNET, 1999), podendo ocasionar uma perda de variabilidade genética através de processos como deriva genética e endogamia (HANSKI; GILPIN, 1997; HEDRICK, 2001; KELLER; WALLER, 2002).

Em *R. schneideri*, as diferentes populações analisadas exibiram uniformidade nos estoques de variabilidade genética com baixos níveis de endogamia, não sendo observado níveis significativos de organização estrutural na espécie pelos diferentes métodos de análises (*Fst*, *Rst*, *Nm* e análise bayesiana). *R. schneideri* é uma espécie amplamente distribuída na América do Sul, com elevada abundância até mesmo em paisagens antropizadas (COCHRAN, 1955; SILVANO; PIMENTA, 2003). A ausência de isolamento por distância observada em *R. schneideri* e, os níveis altos de *Nm*, sugerem um potencial elevado de dispersão (grande potencial panmítico) responsáveis pela similaridade genética das populações.

Entretanto, nas espécies *H. raniceps* e *L. chaquensis*, reduções nos níveis de diversidade genética foram detectadas nas populações do Tietê Batalha (Sales e Novo Horizonte) que se apresentaram também estruturadas em relação às demais populações do Baixo Tietê. O padrão significativo de isolamento por distância e baixo *Nm* detectado em ambas as espécies, sugere uma baixa capacidade de dispersão.

De acordo com Rudorff et al. (2004), a região do Tietê Batalha (Sales e Novo Horizonte) é caracterizada por intenso cultivo de cana-de-açúcar (37% de cobertura), enquanto que no Baixo Tietê esse tipo de prática não ultrapassa os 9%. A região do Baixo Tietê tem como matriz predominante pastos sem sombra, que pode ser um ambiente hostil aos anfíbios, porque os animais ectotérmicos sofrem dessecação e riscos de predação (ROTHERMEL; SEMLITSCH, 2002). Contudo, essa prática antropogênica parece ser mais adequada à dispersão dessas espécies do que o cultivo intensivo de determinadas culturas (e.g. cana-de-açúcar).

A diferença encontrada entre a espécie *R. schneideri* para as espécies *H. raniceps* e *L. chaquensis*, pode estar relacionada à baixa capacidade de dispersão das duas últimas espécies, bem como a diferenças relacionadas à percepção espécie-específica da permeabilidade das matrizes dos campos agrícolas adjacentes (WIENS, 1997). Assim, espécies com baixa vagilidade (com isolamento por distância e baixo Nm) e percepção são mais prejudicadas por culturas agrícolas intensivas e densas (e.g. cana-de-açúcar). A agricultura promovendo fragmentação do hábitat, aumenta o papel da deriva genética e por consequência reduz a variabilidade de marcadores genéticos neutros e média de valores de características relacionadas a aptidão (Johansson et al. 2007).

Em estudo de meta análise, DiBattista (2007) encontrou uma forte associação entre o aumento de alguns distúrbios humanos (e.g. assentamentos humanos, auto-estradas) e a redução na variação genética neutra, enquanto outras perturbações não tiveram efeito (e.g. caça / culturas agrícolas). Entretanto, nossos resultados permitem concluir que as práticas agrícolas têm um efeito direto na redução da diversidade genética em anfíbios, quando essas culturas afetam a dispersão das espécies e dessa forma promovem uma fragmentação do hábitat.

Implicações conservacionistas

Para *R. schneideri*, independente do tipo de perturbação antrópica nas diferentes áreas avaliadas, não foram visualizados declínios na variabilidade genética, estando esses resultados de acordo com os estudos que apontam a adaptabilidade da espécie a perturbações humanas.

A existência de formas intermediárias entre *R. schneideri* e *R. ictérica* foram reportadas por Kloss (1972) e Haddad et al. (1990). A análise da hibridização é um aspecto bastante relevante para gestores de conservação e os marcadores

moleculares como os microssatélites são altamente recomendados para testar mecanismos de isolamento reprodutivo. Assim, indicamos que a medida de ação atual para essa espécie (ou complexo de espécies) é a determinação do seu *status* taxonômico em zonas de transição, por meio de marcadores microssatélites com vistas a planejamentos futuros de conservação, caso necessário.

Nas espécies *H. raniceps* e *L. chaquensis*, as principais medidas mitigadoras devem ser focadas na recuperação da diversidade genética nas populações inseridas na região do Tietê Batalha. A paisagem agrícola encontrada nessa região (37% de cobertura por cana-de-açúcar) deve estar contribuindo para o declínio da dispersão.

Os resultados evidenciados aqui não apontam momentaneamente um alto nível de endogamia nas populações depauperadas geneticamente (a exceção da população de Sales de *L. chaquensis*), mas essa última estimativa é preocupante visto estar correlacionada à aptidão e tamanho populacional (REED; FRANKHAM, 2003). As medidas mitigatórias incluem a seleção das populações do Tietê Batalha como unidades de manejo com fluxo gênico restrito com as populações do Baixo Tietê e, portanto, sujeitas a planos prioritários, além da redução do cultivo de práticas agrícolas de monoculturas densas (e.g. cana-de-açúcar) e a criação de corredores ecológicos, visando melhorar a permeabilidade do entorno e, conseqüentemente significar um prelúdio para recuperação dos níveis de diversidade genética para essas populações. Apontamos também a necessidade de monitoramentos ecológicos e genéticos de longo prazo (> 5 anos), durante a temporada reprodutiva das populações do Tietê Batalha, para avaliar o impacto das medidas mitigatórias na recuperação da diversidade genética dessas populações.

CONCLUSÕES

- O método de hibridização seletiva foi conspícuo na captura de microssatélites nas espécies de anfíbios analisadas, estando esse sucesso relacionado à densidade maior de microssatélites no genoma e aos tipos de sondas escolhidas (CA₁₅ e CT₁₂);
- As bibliotecas CA_n/GT_n foram mais ricas em microssatélites, indicando maior abundância desse tipo de motivo no genoma dos anfíbios avaliados;
- A modificação na técnica de iniciador universal marcado, elaborada no presente estudo, minimizou as amplificações inespecíficas e a competição entre os iniciadores sendo indicada para genotipagem de organismos com genoma extenso;
- As populações de *R. schneideri* não exibiram reduções nos níveis de diversidade genética ou estruturação populacional, sugerindo um elevado potencial de dispersão da espécie, mesmo em paisagens fortemente impactadas por processos antropogênicos;
- Em *H. raniceps* e *L. chaquensis*, as populações localizadas na região do Tietê Batalha, caracterizada por forte impacto agrícola, apresentaram empobrecimento genético;
- As práticas agrícolas têm efeito direto na redução da diversidade genética em anfíbios, quando as culturas são hábeis na redução da dispersão;
- Espécies com baixa vagilidade, percepção e com isolamento por distância, são mais prejudicadas por culturas agrícolas intensivas e densas (e.g. cana-de-açúcar);
- Em *R. schneideri*, a principal medida conservacionista é avaliar o *status* taxonômico da espécie em zonas de hibridização com *R. ictérica* por meio de marcadores microssatélites;
- Para as espécies *H. raniceps* e *L. chaquensis*, são necessários medidas que recuperem a conectividade dos fragmentos no Tietê Batalha como: limitação das

áreas de plantio, criação de corredores ecológicos entre as lagoas de reprodução, monitoramentos de longo prazo (ecológicos e genéticos).

Referências

- ALEXANDER, M. A.; EISCHEID, J. K. Climate variability in regions of amphibian declines. **Conservation Biology**, v. 15, p. 930-942, 2001.
- ALFORD, R. A.; RICHARDS, S. J. Global amphibian declines: a problem in applied ecology. **Annual Review of Ecology Systematics**, v. 30, p. 133-165, 1999.
- ANTOLIN, M. F.; SAVAGE, L. T.; EISEN, R. J. Landscape features influence genetic structure of Black-Tailed Prairie Dogs (*Cynomys ludovicianus*). **Landscape Ecology**, v. 21, p. 867-875, 2006.
- ARIGONI, S.; LARGIADÈR, C. R. Isolation and characterization of microsatellite loci from the ocellated wrasse *Symphodus ocellatus* (Perciformes: Labridae) and their applicability to related taxa. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 2166-2169, 2000.
- ARMOUR, J. A. et al. Isolation of human simple repeat loci by hybridization selection. **Human Molecular Genetics**, v. 3, p. 599-605, 1994.
- ARRUDA, M. P.; MORIELLE-VERSUTE, E. Cytogenetic and random amplified polymorphic DNA analysis of *Leptodactylus* species from rural and urban environments (Anura, Amphibia). **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 1, p. 161-176, 2008.
- _____. et al. Genotyping of molecular markers using dye-labeled universal primer method from extensive and unknown genomes. **Molecular Biology Reports**, v. 37, p.2031-2036, 2010
- AVISE, J. C. **Phylogeography**: The history and formation of species. Cambridge: Harvard University Press, 2000. 447p.
- BASTOS, R. P. et al. **Anfíbios da Floresta Nacional de Silvânia**, Goiânia, Goiás, Brazil, 2003.
- BEEBEE, T. J. C. Conservation genetics of amphibians. **Heredity**, v. 95, p. 423-427, 2005.
- BENNETT, A. F. **Linkages in the Landscape**: the Role of Corridors and Connectivity in Wildlife Conservation. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK, 1999.
- BENNETT, P. Demystified.... Microsatellites. **Molecular Pathology**, v. 53, p. 177-183, 2000.
- BRANDSTROM, M.; ELLEGREN, H. Genome-wide analysis of microsatellite polymorphism circumventing the ascertainment bias. **Genome Research**, v. 18, p. 881-887, 2008.
- BROWN, S. M. et al. Multiple methods for the identification of polymorphic samples sequence repeats (SSR) in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 93, p. 190-198, 1996.

BURNS, E.; ELDRIDGE, M. D. B.; HOULDEN, B. A. Microsatellite variation and population structure in a declining Australian *Hylid* *Litoria aurea*. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 1745-1757, 2004.

CARVAJAL-CARMONA, L. G. et al. Strong Amerind/white sex bias and a possible Sephardic contribution among the founders of a population in Northwest Colombia. **American Journal of Human Genetics**, v. 67, p. 1287–1295, 2000.

CASTELO, A. T.; MARTINS, W.; GAO, G. R. TROLL – Tandem repeat occurrence locator. **Bioinformatics**, v. 18, n. 4, p. 634-636, 2002.

CHAMBERS, G. K.; MACAVOY, E. S. Microsatellites: consensus and controversy. **Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology**, v. 126, p. 455-476, 2000.

CHAN, L. M. Characterization of microsatellite markers for Couch's spadefoot toad (*Scaphiopus couchii*) and cross-amplification in other species of the family Scaphiropodidae. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, p. 318-320, 2007a.

_____. Twelve novel microsatellite markers for the Great Plains toad, *Bufo cognatus*. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, p. 278-280, 2007b.

CHISTIakov, D. A.; HELLEMANS, B.; VOLCKAERT, F. A. M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: a review with special reference to fish genetics. **Aquaculture**, v. 255, p. 1-29, 2006.

CIPRIANI, G. et al. AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L) Batsch]: isolation, characterisation and cross-species amplification in *Prunus*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 99, n.1-2, p. 65-72, 1999.

COCHRAN, D. M. Frogs of southeastern Brazil. **Bulletin United States National Museum**, v. 206, p. 1-411, 1955.

COLLI, G. R.; BASTOS, R. P.; ARAÚJO, A. F. B. **The character and dynamics of Cerrado herpetofauna, in the cerrado of Brazil**: Ecology and Natural History of a Neotropical Savanna, edited by Oliveira PS & Marquis RJ. Columbia University Press, New York, 2002.

CORNUET, J. M. et al. New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. **Genetics**, v. 153, p. 1989–2000, 1999.

CROZIER, R. G. Preserving the information content of species: genetic diversity, phylogeny and conservation worth. **Annual Review of Ecology Systematics**, v. 28, p. 243-268, 1997.

DA SILVA, A. et al. Genetic diversity-fitness correlation revealed by microsatellite analyses in European alpine marmots (*Marmota marmota*). **Conservation Genetics**, v. 7, p. 371-382, 2006.

DIBATTISTA, J. D. Patterns of genetic variation in anthropogenically impacted populations. **Conservation Genetics**, DOI 10.1007/s10592-007-9317-z. 2007.

DUELLMAN, W. E. Distribution patterns of amphibians in South America; p. 255-328. In DUELLMAN W. E. (ed.). **Patterns of distribution of amphibians: A global perspective**. Baltimore and London: The Hopkins University Press, 1999.

ELLEGREN, H. Inbreeding and relatedness in Scandinavian grey wolves *Canis lupus*. **Hereditas**, v. 130, p. 239–244, 1999.

_____. Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. **Trends in Genetics**, v. 16, p. 551–558, 2000.

_____. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, p. 435-445, 2004.

EPPERSON, B. K. **Geographical genetics**. New Jersey: Princeton University Press, 2003. 327 p.

EWERS, R. M. Are conservation and development compatible? **Trends in Ecology & Evolution** v. 20, p. 159, 2005.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. 3. ed. Brasília: Embrapa-CENARGEM, 1998. 220 p.

FICETOLA, G. F.; BERNARDI, F. D. Amphibians in a human-dominated landscape: the community structure is related to habitat features and isolation. **Biological Conservation**, v. 119, p. 219-230, 2004.

FRANKHAM, R. Inbreeding and extinction – a threshold effect. **Conservation Biology**, v. 9, p. 792–799, 1995.

_____. Relationship of genetic variation to population size in wildlife. **Conservation Biology**, v. 10, p. 1500–1508, 1996.

_____; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Introduction to Conservation Genetics**. Cambridge University Press, Cambridge, 2003.

GARCIA, J. E. et al. Identification of microsatellites DNA markers for the giant anteater *Myrmecophaga tridactyla*. **Journal of Heredity**, v. 96, n. 5, p. 600-602, 2005.

GARNER, T. W. J. Genome size and microsatellites: the effect of nuclear size on amplification potential. **Genome**, v. 45, p. 212-215, 2002.

GOLDSTEIN, D. B.; POLLOCK, D. D. Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic inference. **Journal of Heredity**, v. 88, p. 335–342, 1997.

- GONZÁLEZ-CANDELAS, F.; MONTOLIO, A. Genetic differentiation and structure of *Hippocrepis valentina* (Leguminosae) populations. **Journal of Heredity**, v. 91, p.134-141, 2000.
- GRAY, M. J.; SMITH, L. M.; BRENES, R. Effects of agricultural cultivation on demographics of southern high plains amphibians. **Conservation Biology**, v. 18, p. 1368-1377, 2004.
- GROVER, A.; SHARMA, P. Microsatellite Motifs with Moderate GC Content Are Clustered Around Genes on *Arabidopsis thaliana* Chromosome 2. **In Silico Biology**, v. 7, n. 2, p. 201-213, 2007.
- HADDAD, C. F. B.; CARDOSO, A. J.; CASTANHO, L. M. Híbridação natural entre *Bufo ictericus* e *Bufo crucifer* (Amphibia: Anura). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 50(3), p. 739-744, 1990.
- HADDAD, C. F. B.; ABE, A. S. **Anfíbios e Répteis**. Workshop Mata Atlântica e Campos Sulinos, 1999.
- HAIG, S. M.; AVISE, S. M. Avian Conservation Genetics. In: AVISE, J. C.; HAMRICK, J. R. **Conservation Genetics: Case Histories from Nature** (J.C. Avise and J.R. Hamrick, eds.). New York: Chapman and Hall, p. 160-189. 1996.
- HAMILTON, M. B.; FLEISCHER, R. C. Cloned microsatellite repeats differ between 4-base restriction endonucleases. **Journal of Heredity**, v. 90, p. 561-563, 1999.
- HANCOCK, J. M. Simple sequences in a "minimal" genome. **Nature Genetics**, v. 13, p. 14-15, 1996.
- HANSKI, I. A.; GILPIN, M. E. **Metapopulation Biology: Ecology, Genetics, and Evolution**. Academic Press, San Diego, 1997.
- HEDRICK, P. W. Conservation genetics: where are we now? **Trends in Ecology & Evolution**, v. 16, p. 629-636, 2001.
- HEYER, R. et al. *Leptodactylus chaquensis*. In: IUCN 2009. **IUCN Red List of Threatened Species. 2004**. Version 2009.1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 07 October 2009.
- HOFFMAN, J. I.; BOYD, I. L.; AMOS, W. Exploring the relationship between parental relatedness and male reproductive success in the Antarctic fur seal *Arctocephalus gazella*. **Evolution**, v. 58, p. 2087-2099, 2004.
- HOLDEREGGER, R.; KAMM, U.; GUGERLI, F. Adaptive vs. neutral genetic diversity: implications for landscape genetics. **Landscape Ecology**, v. 21, p.797-807, 2006.
- HOPKINS, M. S. et al. Discovery and characterization of polymorphic simple sequence repeats (SSR) in peanut. **Crop Science**, v. 5, p. 109-117, 1999.

JEHLE, R.; ARNTZEN, J. W. Review: microsatellite markers in amphibian conservation genetics. **Herpetological Journal**, v. 12, p. 1-9, 2002.

JOHANSSON, M.; PRIMMER, C. R.; MERILÄ, J. Does habitat fragmentation reduce fitness and adaptability? A case study of the common frog (*Rana temporaria*). **Molecular Ecology**, v. 16, p. 2693-2700, 2007.

KARAGYOZOV, L.; KALCHEVA, I. D.; CHAPMAN, V. M. Construction of random small-insert genomic libraries highly enriched for simple sequence repeats. **Nucleic Acids Research**, v. 21, p. 3911-3912, 1993.

KATTI, M. V.; RANJEKAR, P. K.; GUPTA, V. S. Differential distribution of simple sequence repeats in eukaryotic genome sequences. **Molecular Biology and Evolution**, v. 18, p. 1161-1167, 2001.

KELLER, L. F.; WALLER, D. M. Inbreeding effects in wild populations. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 17, p. 230-241, 2002.

KIJAS, J. M. et al. Enrichment of microsatellites from the citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles. **Biotechniques**, v. 16, p. 656-662, 1994.

KLOSS, G. R. **Os Rhabdias dos Bufo do grupo Marinus**. Um estudo de espécies crípticas (Nematoda: Rhabditoidea). Doctoral thesis, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, 1972.

KRAAIJEVELD-SMIT, F. J. L. et al. Low gene flow but high genetic diversity in the threatened Mallorcan midwife toad *Alytes muletensis*. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 3307-3315, 2005.

KRONKA, F. J. N. et al. **Inventário florestal do Estado de São Paulo**. Instituto Florestal: São Paulo, 1993.

KUHNER, M. K.; YAMATO, J.; FELSENSTEIN, J. Maximum likelihood estimation of population growth rates based on the coalescent. **Genetics**, v. 149, p. 429-434, 1998.

LATTA, R. G.; MITTON, J. B. A comparison of population differentiation across four classes of gene markers in limber pine (*Pinus flexilis* James). **Genetics**, v. 146, p. 1153-1163, 1997.

LA MARCA, E. et al. *Hypsiboas raniceps*. In: IUCN 2009. **IUCN Red List of Threatened Species**. 2004. Version 2009.1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 04 December 2009.

LEE, B. et al. A second generation linkage map of tilapia (*Oreochromis* spp.). **Genetics**, v. 170, p. 237-244, 2005.

LESBARRÈRES, D. et al. Environmental and population dependency of genetic variability-fitness correlations in *Rana temporaria*. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 311-323, 2005.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant population. **Annual Review of Ecology Systematics**, v. 15, p. 65-95, 1984.

LUIKART, G.; CORNETT, J. M. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. **Conservation Biology**, v. 12, p. 228-237, 1998.

LYNCH, M.; RITLAND, K. Estimation of pairwise relatedness with molecular markers. **Genetics**, v. 152, p. 1753-1766, 1999.

MAGUIRE, T. L. Producing and exploiting enriched microsatellite libraries. In: HENRY, R. J. (Eds.) **Plant Genotyping: the DNA Fingerprinting of Plants**. Centre for Plant Conservation Genetics, Southern Cross University, Lismore, Australia, CABI Publishing, 2001, 193-210.

MARKERT, J. A. et al. Neutral locus heterozygosity, inbreeding, and survival in Darwin's ground finches (*Geospiza fortis* and *G. scandens*). **Heredity**, v. 92, p. 306-315, 2004.

MARSH, D. M. Fluctuations in amphibian populations: a meta-analysis. **Biological Conservation**, v. 101, p. 327-335, 2001.

MECH, S. M.; HALLET, J. G. Evaluating the effectiveness of corridors: a genetic approach. **Conservation Biology**, v. 15, p. 467-474.

MORITZ, C. Conservation units and translocation: strategies for conserving evolutionary processes. **Hereditas**, v. 130, p. 217-228, 1999.

NOËL, S. et al. Impact of urban fragmentation on the genetic structure of the eastern red-backed salamander. **Conservation Genetics**, v. 8, p. 599-606, 2007.

O'DONNELL, W. T.; WARREN, S. T. A decade of molecular studies of fragile X syndrome. **Neurosciences**, v. 25, p. 315-338, 2002.

OLAISEN, B.; STENERSEN, M.; MEVAG, B. Identification by DNA analysis of the victims of the August 1996 Spitsbergen civil aircraft disaster. **Nature Genetics**, v. 15, p. 402-405, 1997.

OOSTERHOUT, C. V. et al. MICRO-CHECKER software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p. 535-538, 2004.

PALO, J. U. et al. High degree of population subdivision in a widespread amphibian. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 2631-2644, 2004.

PEREZ-SWEENEY, B. M.; RODRIGUES, F. P.; MELNICK, D. J. Metodologias moleculares utilizadas em genética da conservação. p. 343-380 In: CULLEN, Jr. L.; RUDRAN, R.; VALLADARES-PADUA, C. **Métodos de estudos em biologia da conservação e manejo da vida silvestre**. Curitiba: UFPR e Fundação O Boticário de Proteção à Natureza, 2004.

PRIMMER, C. R.; MERILÄ, J. A low rate of cross-species microsatellite amplification success in Ranid frogs. **Conservation Genetics**, v. 3, p. 445-449, 2002.

PRÖHL, H. et al. Polymerase chain reaction primers for polymorphic microsatellite loci from the túngara frog *Physalaemus pustulosus*. **Molecular Ecology Notes**, v. 2, p. 341-343, 2002.

REED, D. H.; FRANKHAM, R. Correlation between fitness and genetic diversity. **Conservation Biology**, v. 17, p. 230-237, 2003.

ROA, A. C. et al. Cross-species amplification of cassava (*Manihot esculenta*) (Euphorbiaceae) microsatellites: allelic polymorphism and degree of relationship. **American Journal of Botany**, v. 87, n. 11, p. 1647-1655, 2000.

ROGELL, B.; GYLLENSTRAND, N.; HOGLUND, J. Six polymorphic microsatellite loci in the Natterjack toad, *Bufo calamita*. **Molecular Ecology Notes**, v. 5, p. 639-640. 2005.

ROTHERMEL, B. B.; SEMLITSCH, R. D. An experimental investigation of landscape resistance of forest versus old-field habitats to emigrating juvenile amphibians. **Conservation Biology**, v. 16, p. 1324-1332, 2002.

ROUSSET, F. **Genetic structure and selection in subdivided population**. New Jersey: Princeton University Press, 2004. 288 p.

RUDORFF, B. F. T. et al. **Estimativa de área plantada com cana-de-açúcar em municípios do estado de São Paulo por meio de imagens de satélites e técnicas de geoprocessamento: ano safra 2003/2004**. São José dos Campos: Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, 47 p. (INPE-10791-RPQ/759), 2004.

SCHLÖTTERER, C. The evolution of molecular markers- just a matter of fashion. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, p. 63-69, 2004.

SCHWARTZ, M. K.; TALLMON, D. A.; LUIKART, G. Review of DNA-based census and effective population size estimators. **Animal Conservation**, v. 1, p. 293-299, 1998.

SCRIBNER, K. T. et al. Environmental correlates of toad abundance and population genetic diversity. **Biological Conservation**, v. 98, p. 201-210, 2001.

SEDDON, N. et al. Male heterozygosity predicts territory size, song structure and reproductive success in a cooperatively breeding bird. **Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences**, v. 271, p. 1823-1829, 2004.

SHAFFER, H. B. et al. The genetics of amphibian declines: population substructure and molecular differentiation in the Yosemite Toad, *Bufo canorus* (Anura, Bufonidae) based on single-strand conformation polymorphism analysis (SSCP) DNA mitochondrial DNA sequence data. **Molecular Ecology**, v. 8, p. 245-257, 2000.

SHARMA, P. C.; GROVER, A.; KAHL, G. Mining microsatellites in eukaryotic genomes. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 11, p. 490-498, 2007.

SILVANO, D. L.; PIMENTA, B. V. S. Diversidade e distribuição de anfíbios anuros na Mata Atlântica do sul da Bahia. In: PRADO, P. I. et al. (orgs.) **Corredor de Biodiversidade na Mata Atlântica do Sul da Bahia**. Published on CD-ROM, Ilhéus, IESB / CI / CABS / UFMG / UNICAMP, 2003.

SIMANDLE, E. T. et al. Sixteen microsatellite loci for the *Bufo boreas* group. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, p. 116-119, 2006.

SMITH, M. A.; GREEN, D. M. Dispersal and the metapopulation paradigm in amphibian ecology e conservation: are all amphibian populations metapopulations?. **Ecography**, v. 28, p. 693-695, 2005.

STUART, S. N. et al. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. **Science**, v. 306, p. 1783-1786, 2004.

TALLMON, D. A. et al. Genetic differentiation among long-toed salamander (*Ambystoma macrodactylum*) populations. **Copeia**, v. 2000, p. 27-35, 2000.

TEMNYKH, S. et al. Computational and experimental analysis of microsatellites in Rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. **Genome Research**, v. 11, p. 1441, 2001.

TÓTH, G.; GÁSPÁRI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. **Genome Research**, v. 10, p. 967-981, 2000.

WALTER, R. B. et al. A microsatellite genetic linkage map for *Xiphophorus*. **Genetics**, v. 168, p. 363-372, 2004.

WEBER, J. L. Informativeness of human (dC0dA)_n.(dG-dT)_n polymorphisms. **Genomics**, v. 7, p. 524-530, 1990.

WHITELEY, A. R.; SPRUELL, P.; ALLENDORF, F. W. Can common species provide valuable information for conservation? **Molecular Ecology**, v. 35, p. 2767-2786, 2006.

WIENS, J. A. Metapopulation dynamics and landscape ecology. Pages 43-68 In Hanski IA, Gilpin ME. editors. **Metapopulation biology: ecology, genetics, and evolution**. Academic, New York, 1997.

WILCOX, B. A.; MURPHY, D. D. Conservation strategy: the effects of fragmentation on extinction. **American Naturalist**, v. 125, p. 879-888, 1985.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 1-16, 2002.

ZEISSET, I.; BEEBEE, T. J. C. Population genetics of a successful invader: the marsh frog *Rana ridibunda* in Britain. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 639-646, 2003.

ZUCOLOTO, R. B.; VERDADE, L. M.; COUTINHO, L. H. Microsatellite DNA library for *Caiman latirostris*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 294, p. 346-351, 2002.

YEEH, Y.; KANG, S. S.; CHUNG, M. G. Evaluation of the natural monument populations of *Camellia japonica* (Thearacea) in Korea base don allozyme studies. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 37, p 141-146, 1996.

[illegible]

- ACACGTTACACACACAGCTCTGGACTGTCAGCTGCTGCACTGCATGCGTTACAC
ACACACACAGCTCTGCAGTGCACGCTTACACACACTCAGTAGCATAGTAACATAGTTTATAAGGCTGAAAAA
AGCCCTCTGTCCATCCAGTTCGGCCTGTTATCCTGCAAGTT
- Rschnp10* GTACCTCTCCCATGGACTCCATGCTGACCCCGCCTTCTCCTCTTCAGTCTTCTTCTTTTCTTGCCCCACAGA
AAGTCCTGATGCAGCCGTGTCAAGACACAAGAACTATGGGCATGGTGATAGTGACACACACAGGGGGACA
GACACACACACACGGGGCAGGGACAGAGACACACACAGGGACAGAGACAGCGACGCACACACACGCAGGGA
CAGAGACACACAGGGACAGAGACACACACACAGGGACAGAGACAGCGACGCACACACACAGGGACAGCGG
CACATACAGGGACAGCGGCACACAAGGATAGAGACAGACACACAGGGACAGACACACAGCTTGGCCTCAC
CAAACCTCAGCTCCAACCTCTATGGCTCCTGTCTGTAAAGCAACACAGCTCACTGCTCCTCTGGCTCCTCCCC
ACTGGTCACATGGGCGGATGATGTCAGGAAGGTCCTTTAGCCCACTAAGAAGCCTGGACTGCAGGGATGAGC
GGATC
- Rschnp11* GATCTCTACAGTGCCTGCCCCCTTGTGTCTGTTCTCTGACCCCATATTTAGGTTACTGATTAACCCCTCCAC
TGGTGTCTGATGGACAGAGGGGTGATGGCACCTACTTCTCCAGGCTGCCTGTGAGGACCAGACATCAGC
TGTCTACAGGAAGGTAAGTGTCTGTGTGAGAAATAGGTGATAACACAGCTGCGTGTAATATGTATGTGTGT
GTGTATATATATATATATATCTACACACACACACACAGTATATATGTCCATATATGTGGTGTGCGCATGTATGT
GGTGATGTGTACGAGTGCATCCATGTATGTGGTGAGTGTGTGTACGAGTGCCTCATGTATGTGGTGAGTG
CGTGATGAATGCGTCCATGTATGTGGTGTGTGTGTATATATGAGTGTGTCCATTAATTGGGGAGTGGCCTAAG
TTGGAGAGTCCATGTATGTTGTG
- Rschnp12* CCTGATGTGTGCTGTGAGCTTCTATTGGCTGATAAAGGTCATGTGACCAGGCTACTATTGGCTAATGCATTTT
TTATGGGAATATCTCAGGAACGGTACGTCTCGGAGAGTTGAAAACCTGTTCTAAAACCTTCCCGGACACCTGAT
GTACATGTGTGCCAAATTTCTGTATTGTAGCTGCAGCGGTGCGGATTCCTTTAGCGGACACACACACACAC
ACACACACACACACACACACTCAGCTTTATATATTAGATATATATATATACACATATATATATATATACCTTCT
TACGCATGCAGAAATGGGACAAACAATACTGCAGGGGGCTGGTTTTAGTTGTGTATAAAAAATCCTATAAATGTCA
CTGGTGTCTGGGATATATATTTTTTATGTTATGCTCTTCATAATAAATGTCGCTAATAACAGACCTTTATAAAA
CCAAATCAGCACTGACCTGTCATAGCTGTGTT
- Rschnp13* GATCCAAGATGGTGATGATAACAAGGAGGCTGAATACTTCATGCCAGCCCTTACTCCCCCTACGGGGCCATCA
CAACAATGCTTTCTGCTCAGATGCCCCACCGGTGCAGTATCACCAGGGTATCATCAGGGTTACTCCCAACA
ATATAGAAGGCCACCACAGAACTACAGAAATCAGCCAGAATACCCTACGGCGCCAGGACTAATATGTTGAAA
TGCGGCAAGGAAGGACACATTACAGGAAGTGTGGCGTGGACTACGATTGCGGGCCCCCCCCCGCAATGG
CCCACTGCCTTTTTCGCCCAGACCAACATCCATGTACTACCACAAGGACCTCTACAACAACAACAACAACA
CAACAACAAAGTACCCCCACCATGATAATAACCAATGAAGGTCAGGCCAGCCGTACCCCTCATGCCTGCC
CCCTCCTTTGGAGAGTCTTCTGCTCCACAGTTGTTCTGGAGGTGGATAATACACCTGTTCCCTTCATGGTGAC
ACGGGTGCGGG
- Rschnp14* CACGCACATTATACATCCAGCTGTGCAGGGCAGGCACATTATACATCCAGCTGTGCAGTGCACACACAT
AGAGCTCTGCAGTACACTTTATACACACTCAACTCCGAAGTGCACACACATACATACAGCTCTGCATCGCAT
ATTATACACACCTAACTCTGCAGTGCACACACATTATACATATAGGTCTGGAGCGCACATTATATACACA
GCTCTGCAGTACACATTATACACACACACACACACTTTTGCAGTGCACACACACATACACACTCAGCT
CTCATAATGACACTACGCCTCTGAACAACATGAAGTGCAGTCCGGTCTTCTCTGCTCAGTACAGGCTCTTTC
CAGTCAGGTGACTGATCGAG
- Rschnp15* GATCCTGGTGTGGCAGAGTTGCACACCACAGTCCGTCGGTATCCTCACTTTCTTTAAAGAACCTCCAGACTT
GCGAACATCTAGGCCTCGCCACGGGAGCTTCACTACGTGAAACAGTTGCTGATGATGCACCAGCTCTGCCCT
GCTTACCCTCTGGCCACGCCACTGCCTCTTACAACCTGTTCTGGTGCAGCACTCGCTCCGCTCAGAAGCA
CTATCTTCACTCGGCATATCAACCCAGCTTGGGTGAGTACCTCGTCATCCTCCGATTCTCAGAGCTGCTCCCT
CCTCGGAATTCCTCCCTAACAAACAACCTTACCAGTGTGACACCTCTTACAACCTTCTTCACTAAGTCAA
CGTTGTCATCATCATCATCAACACAGACTGCGACAGTTGGAAAACCTTGGGACCTCGGGAACGAGGTGACG
AGCAACCTGAGAAGTGGTTTGTGACTCTGGAAAGGTCCAGAAAACAGTTCTGAGAGTATGCCGATCGCA
TTCCAAATTTTCTGGGAGGGGGCAGACTGGGGGGAAGGAGGTTGAGGTGGTGGAGCCACAGGAGTGCTCC
CTTGGTAACGTGGGTGACTGCGTGGAAGACTGACTGGTG
- Lchaqμ1* GATCTAGTTATACGAGCCAGTGGCAAAATAGAGGAGTCAGCAGTGTGGCCTACGGACTCTGTGGCCCTGACTC
CCAAAAAGAAAAATATTGGGTAAGTTGAAATATGACTGTGCCCCAGCATTTTCTATGTGGGAGAGTTAAGACAC
CTCCATAAATCTTGGATGGTCAGGCAGTTAGCAGATGTGTCTGGTAGTATTTACATCAAGGTGCTCATTCTTT
ATAGATAACACACACACACACACACAAATGCTGGGTTTCATGGTATGGACTAATGAAAGTAAAGGGTGAAAA
AGTGGCGGCACCTGGTAAGTGGCAATATGGCTGCCCCCCCCAGGCTCTGCTGCAGCCTGCAATGCATTCTC
CAAGGTCAAATGGTCTATCCAGCTTGCCCTTTGAGTTGCCAGCTAGACCATGAGTCACATGAAGCTACCCAA
CGGTGATGCTGGACACATGGACACTCGCTCCTCCCAATATAGATTCCAGGCCACAGTGGTAAATAGCATGCTT
CCACTGGACAGGGGATGCACCGGACCAACAAACAAGTGGTCTACTCACAAGAGTAGGGGTGCTGGTT
CATAGAATGAATGTTGCTTTTTTGGCCATTGCTCCACAAGCTCGTCTACTCTCCTCGAGCTAGCCTCCAAGT
TGACCTAAACGTGGACCGTACACTAAATACAGAACCATAACCATCCTGGATGACAACCTGATGT
- Lchaqμ2* CATACATACACACAGCACACCGCCTCTGCTACATACATACATACACACAGCACACCGCCTCTGCTACATACA
TACATACATACACACAGCACACCGCCTCTGCTACATACATACATACACAGCACACCGCCTCTGCTACATAC
ATACATATATAGTGTGCGGTGACTCGCCGGTGCAGGAGGAGGATGATTGACCTGGAATGGGATGATGATG
GGGTATGTACGC
- Lchaqμ3* GATCCACATCCAAATGCCACCATACAGGTACACACACCCCATCCGCATACACCCATACAGGTACACACACCAT
CCACATCCAAATACCACCATACGGTACACACTCCCCATCCACATACAGGTACACACTCCCCGTCCACATACA
ACCATACAGGGGCACACACACACACATCCACATCCAAATACCACCATACAGGGTACACACACACACCATC
CAGAGTCCAC

- Lchaqμ14* GATCTGAAAATGTCAGTGGGAGGAAACAAATACTCTGACAGAACTCATAAAACGTGTTTGAAC TCAAAAACACA
GTGCAACGGCAATAGGGAGAAAAACCGTCCCAATGCACCTTGAGCAAAATAGAAGTGTGTTTGCATTCCGTAAG
CTTGATTTTTATGGGAGCAAAAGCACATTTTATATTTATTTATATGTGGTGGGCCTATGCAAAATCTACGGCCCC
ATAAATACACAGAGGGATTGTTTTCTGGGAAAATCTGAGAAAGAAAACAACCTTGGCATGTATTATGGAATGT
ATTACTTGCATACGGTTGCAATGTCAACCGAAGAGAGTCTTCCGCGGGTGACTTGCTAATGGTATCTCAAATCA
AAAGTGGGAGTGGTTTTTCAAGTGTGTAGCACTTAAAAAATGTGGTTATCTGCATGTTTTTAGAGGCCACTTTA
TAACATTAGAACCTAAGTTGTCAAACTTAAATTAAGTAGAGATTCTGCCCTTTCTGTTTGCACCATTTGGTGT
CATGTAACTAGGGAGAGAAAAAAGATGGATTTCATACAAAAAATACCCTCTGAAGCTTGCAAGTTCTGTGG
CTCAGTCAGTATGGCGGTGGATTGGTAAGTTGGCATGCACTCAGGTATGGGTTGATTCTGTCTCATACCTA
AACAGGTAAGGGCTTAAGAT
- Lchaqμ15* GATCATTTTTCTCCAATTCCTGGAATATCTTCCAGATTTCCTCAATATATAGACAAAATAGTAAGATTATTAT
TATTATCTCTGCTGTCTATATAAAAACTAAACCTCTTACAGATAGTTTTATAAATTTTATAAATTGCACAATT
GGACTTACTGGCAATGACCATGTAGACCTTAGCCATAAGTTAAATGATGTGCTACCGTGTGTTTCCCGAAAA
TAAGACATACCCGATAATAAGACATAGTCTGATTTTGTGGGTTGGCTAATATAAGCCATACCCCGAAAAA
AGACATAGCGGGACGTGGTAAAAAATATAAGACATGCGGTACAATGTCGGTACCTTAGTACCGTTACCTTGC
AGAGTCTGATTCCGGCGTTAGCACGTTACGCGGCAGATCGTGGAGAAGAATGAGTGCAGCGATGTAGACG
CCGGGAGCTGCTGTAATCTTCACTGTGATTGGCCAGCAGCTCTGAATCTAGGAAGAGGCGGACCCAGCA
ACCGCAGAGGAACACATGAAGAGGATTCTGCACGCCCCGAGACCAAGCATCTGCGGCCGAGTAACAGGTGAC
ACGCTCCTCGGCCACTACACCCAGCCAAGCCAGACCCAAGACCCAGACCGATTACAGCTTACCCACACACA
CACAATGTCTGCCCATACAGCACCCCCCCCCCAACACACACAGAACACTCCCTGCAGCGTCTCACCTGCAG
ATGACAGCGTCAGCCACACACTGACACAGCGCCCCCTGCAGTGTCTGATC
- Lchaqμ16* ATATGTACATGCAGGCACATTCAAGCACACAAATACATGTAGACACACACATACAAGTACATGTACACAGGCAC
ATGCAAAACACAAGTATACACACACACATATGCACAGATATAAGCAGGCACACACATACATACATATATCC
ATATTTAGGTATATGCAGGCACACAAAGGTACAGATATATATACATATATACTCATGTAAGATGGCAGG
ATATCAGCTCAGCCTCATGCTACTTCTGCTTCTGTCCATTGGCCAGTATCAAAGACTGTAAATAGAGTCTGCC
AAATGGTGCCCCCTTCAGGAAGGGAGGTTCAATCTATTTTCAGTGCACCTGTACTTATCAGTTCAGCAGTGCTT
TGCAGGCAGATGGATC
- Hraniμ1* GGCAGGCACAACCTCCATCTAGTATCCCAACGACAGTAACTACTACAAC TACAACCACAACCTACCATCGACTGTA
CTAGCACTCATGCAGACACAACCTTAACTGTGTCTATCATCAAGTAAACATTTTTTAACTTTTGTCTTGTG
GAGATAATGACCTTTCTCTCTTAAAGGGGATATGTTTTATGATGCATGGTGTAACACACACATACACAC
ACACACAAACACACACACAATAAGTATATATTTTATTATTATGATATATCAACAACATCATGAAACCCCTT
TTTTATGTTGTGTATGTCTTTAGTATCCTGCAGCAGAACTTACCAACAGCTCTTTTAAATTTATCCCACTAAG
CTACTCTCTGTGTTCCATAAGACAGTAAAGTCATAGGTACAAGCATATAGGAAACATAAAGTCAGCTGCTTAGTA
GCAGTGCATATAGAATTGGAATTTTGAATCAATAATAGAAGATAAAAGGCGACACTCACCACGATGACTG
TGCTGTGTTCTCCAAAGTTTGTACTGGATGCTTTTAAAGTACATTATCAAGACTGAGCTATTGTACTAATCAG
ATGACCGCACTGCAACTTGAAGTCAAGTCTCTAGTTGTTGTTAAAAAATGTGTTTAGGAGTAATTTCTGAAAAA
AACTGCCATCATATTGCTACCTTAATTTCCCCCTAGGACTAATTAGGGAATTAGATC
- Hraniμ2* GATCTCGTGTGTCCTGACGCTCCTGTTGATGTAGTTATAAAGTCTTCCGGGTGACGTCACTGGGAAGCGGC
CAACAAGTACATCAAGGGGAGGCAGTGAGCGCGACCCAGGAGATGTGCACGAGCGGTGCCAGGTTAGTAG
TCTGTTTCTTATTTTACCAGGACAACACACACACACACACACACACACAACAACACAACAACACACGCTT
ACCTTGACCTCGCGTTCGGCATCCAACAAAAATGCTCAGTTCCTATAGACTTCTATGGGGTTTCATTATCCAA
TTGTGTATACTGCTGATGTTTACCGTGTTACGGCAGGCAACTGAGACTTGTCTGAATGGTCAGATTGCGACATT
TAGATGAGACCCATCAGAAAACCTCCCGTAATTGAAGTCCATGGGGAATCCAACCTGTGAACAGTGTTCTGATC
- Hraniμ3* ATCCGCATCCAAACACCACCATACAGGTACACACACTCCATCCACATCAAACACCACCATACAGGTAACAC
ACACACACATACACATACATCCATCCACACACCACCATTCAGGTACACACACAGCCATCCACATCCAA
CACCTCCATACAGGAACACACACAAACTTTAACTATGGCATGGCTTATATGCAGTTATAAGCCATGCCATAGT
GTGGCAGCGGCACGGCACTTAACTATGGTATGGCTTACATGCAGTTATAAGCCTTGCAAGTTTGAATGTCTA
TCTGATC
- Hraniμ4* GATCACACACACACACACACACACACACACACAATACTGTGTTCCAGTTAGGTATGATTTGTGTGTAAGTGT
GATGTATACTGTGTTATGGCAGACAATTGCACCTTGTCTGGACAGTCAGCCTGAGACACTCGATGGCAATATCA
CAATGGACTGAGCACACCACTATCACACAGACTGATAGTTAAAGGTAGCACTGACCACTCTGTATATTTTTTTT
TCTTACACACACAAACACACATTGAAATGTGTTACAGTTAGGTATGTGGGATATTTAGTGTAAAGACTGGCAAA
TTGTGTATACTGCTGATGTTTACCGTGTTACGGCAGGCAACTGAGACTTGTCTGAATGGTCAGATTGCGACATT
CAATGGCAATTTACAGTGGACTGAGCACACCATTCACACAGACTGACAGTTAAAGGTAGAAGTACAGCT
TTGTAGGATTTTTTTGACACACACACACACACAATGAAGTATGTTTCAACTGTCTGGCAAAATGTGTACTGAT
AATGTATACCATGTTACAATAAAAAATGTGCCTTTCTGGTAAATATGACAATCTCTATGCTGACAAGCTGTG
TTGTAAGTGAAGTGTGCCAACCACCATCATATACACTGAGCAGTTGTATTTTT
- Hraniμ5* GATCAGCAAGGGGTTCCCTTACAGGTACACACACACACCCCATCCACACACCACCATACAGGTACACACAC
ACACACACATCATTCACATCCAAACACCTCCATACAGGAACACACACAACTTTAACTATGGCAGGCTTATAT
GCAGTTATAAGCAGTACCATAGTTGTGGCTTGATTGTACCTCAGAGACGCGTACAGCTGTCTGTGCCTCC
TACTGGCGCAGGAGAATGCTGGCCAGGAGCAAAATGATGCATCTGAGGTGTGTGTCGGGGGTGATGACGGAG
GTGGGGCAGGGGTGCGGCGATGGCGTGTGATGACGTGTGATGACGTGTGATGACGCGAGTGATATCACGTCA
CGGTGGCAGGGCCAGAGGCGCCGTTCTGATCGGTGGAATTCGGAAGCCGGGTACTGCCTGCATTTTTTATC
AAGTCTACCACTGTTGGTAAATAGGGACAGGTGAGCCTCGAATATAAAAAATCGTGCGTTTCCATATCCGCTTC
ATTGTGATC
- Hraniμ6* GATCTGACTAGGCTGCTCTTGGGTCTCTCATGCTGTTGCCACCCCCACCATTTCTGAATGGGCTGCTCTTGGG
ACTCCTTATGCTGTTGCCACCCCCACCATTTCTGAATGGGCTGCTCTTGGGACTCCTTATGCTGTTGCCACCCC
CACATCCACAATTTTGAAGTGGGCCACTATTGGGACTTCTCATGCTGTTTACAACACACACACACACACACAC

[illegible]

CAGCGCGGGGCCAGGTTAGTAGTCTGTTTCTTCTTTTACCAGGACAACACACACACACACAACACACACAT
ACACCTACCTCGCATTTGGCATCCGACAGAAAA**TACTCGGGTCCCATAGACTTCT**ATGGGGTTCGTTATCTGA
TACGAATACCCAAATATTGGGAACATTTGTAACAGATAACAAGCAGCGGAACATTTTTTTGTTTCGGTCAACTCT
AATCAGAACCCATATGATGTGATTGCATCACATGGCTTCTGATGTGGGACAGAAGGAACATTGACTGCAGCCC
CTGTAATGGTTAACTGCAGCAGATC

Hraniþ 15 GATCTTCTGAGCTCACATTATAGCTCCTTAGCTCTCCAGTGCTATATATATGTGGTGCTGGTCGCTAAGGGGT
AAAGAGTAACTGAAGGTTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTATTAGCAAAGTGATTTCCAGCAATCTACACCACAA
TGGTACCGATAAAA**ATGACAGGTCACGGCAGAA**AAATTAACATACAGAGCGCTGCAGACAAAAAATAAAA
AAGT**TATATATATATATA**CACTCACCGGCCACTTTATTAGGTACAC**CTGTCCAAC TGCTCGTTAACAC**TTAATTT
CTAATCAGCCAATCACGTGGCGGCAACTCAGTGCAATTTAGGCATGTAGACATGGTCAAGACAATCTCCTGCAG
TTCAAACCGAGCATCAGTATGGGGAAGAAAGGTGATTTGAGTGCTTTGAACGTGGCATGGTTGTTGGTGCCA
GAAGGGCTGGTCTGAGTATTTAGAAACTGCTGATC

Hraniþ 16 GATCTCAATGGCAGAGTTCTGCATGGCTTGCCACGAGTTCTAGCCGACTTCCAATCCGGTCCAAAAGTAGCTA
CTTTCAGTACCAGATGTACGATTTTTTTAATATTCTGCCTACTTCAGATGCCTGTGCAATCACGACACTGACCA
CAGGGGAACACACAGAAACATCAAGAACCAGTAGTAGCAGAAATATTTACTACAGCAGGCATTGGATGAGA
TTGAGGTGCAAGCAGCAGCGTGACTCACAGTAACATGATAAAGCAGAGCCATCATCTAGCATGAAATAGA
GACAGCAGCAGCAGTAATTATAGTAACCTCACTTACCCTGCATGGCCTACATCTGGCATGAAATTGACACCGCT
ACATTAATTAC**AGTAACCTCTGTACCCAGCAC**ACCCCATATCAAAAATTGAATGGACAGT**GCAGCAGCAGCA**
GCACAAATTACAGTAATCTCATT**ACCAGGCATACCCCATATCTG**GTATGAAATGCACAGTACAGCTGCAGCAT
GAACTATAGTAACCTTTGTCACCCAGCACATCCACATCTGGCATAAATGGACAGCACAGCATTAAATTACAGTA
ACCTCCATCACCCAGCACACCCACATCTGTTTTGAAATGGACAGCGCAGCTGCAGCATTAAATTAGAGGAACTT
CTGTCACACAGCACACCCACATATGGCAGGATATGGACAGTGCAGCAGTAGCATTAAATTAGTAACCTTCAGTA
ATGCAGCACACCCACATCTGGCATGAGATGGACAGTGCAGCATTCATAAGAGTGATC

Autorizo a reprodução deste trabalho.

São José do Rio Preto, ____/____/____.

Aluno