

LARYSSA SAKAYANAGI TEIXEIRA

**Divergência genética entre diferentes
populações de *Ischnocnema holti* (Anura,
Brachycephalidae) nas áreas de altitude da
Mata Atlântica.**

LARYSSA SAKAYANAGI TEIXEIRA

DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE DIFERENTES POPULAÇÕES DE
ISCHNOCNEMA HOLTI (ANURA, BRACHYCEPHALIDAE) NAS ÁREAS
DE ALTITUDE DA MATA ATLÂNTICA.

Orientador: Célio Fernando Baptista Haddad

Co-orientadora: Mariana Lúcio Lyra

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Campus de Rio Claro, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Rio Claro
2012

597.8 Teixeira, Laryssa Sakayanagi
T266d Divergência genética entre diferentes populações de *Ischnocnema Holti*
(Anura, Brachycephalidae) nas áreas de altitude da Mata Atlântica /
Laryssa Sakayanagi Teixeira. - Rio Claro : [s.n.], 2012
34 f. : il., figs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (Ciências biológicas) - Universidade
Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Celio Fernando Baptista Haddad
Co-Orientador: Mariana Lucio Lyra

1. Anuro. 2. Divergência genética. 3. Filogeografia. 4. *Ischnocnema*. 5.
Marcadores moleculares. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

Dedico a minha família, pelo apoio incondicional;
Ao meu Mestre da vida, Dr. Daisaku Ikeda, pelos
maravilhosos incentivos.

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço aos meus pais e meu irmão, Alda, Moacyr e Gustavo, por todo apoio, dedicação, incentivos e confiança que depositaram em mim durante toda a minha vida, muito obrigada.

Ao meu Mestre da vida, Drº Daisaku Ikeda pelos dedicados esforços e incessantes incentivos.

Agradeço ao Profº Drº Célio Fernando Baptista Haddad, pela orientação e confiança depositada em mim.

Agradeço a Drª Mariana Lucio Lyra e Drª Clarissa Coimbra Canedo pela amizade, MUITA paciência, confiança e principalmente pelo apoio técnico e intelectual que ofereceram para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico (CNPQ) pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento do projeto.

Agradeço a todos os colegas do laboratório, principalmente a Ariadne e Nádia pela ajuda técnica que ofereceram para a conclusão deste trabalho.

Agradeço a toda família CBI 2009, por todos estes inesquecíveis anos de convívio e por toda amizade. Outro agradecimento especial a Puca, Bre, Dani, Carica, Van, Lua, Bia e Malu por todos os momentos de alegrias e tristezas, estudos, conversas e pela amizade incondicional. Agradeço a REP Maravilha e Biga, pela irmandade criada, por todos os momentos vividos e pela amizade que vamos levar para sempre.

Ao meu namorado, Lucas, pelo apoio, amizade e amor incondicional.

A CIA Éxciton por me proporcionar momentos maravilhosos, essenciais para estes últimos anos de graduação.

E por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram ou com conselhos ou críticas, idéias ou ensinamentos, os quais foram de grande importância para meu crescimento e minha formação.

Muito Obrigada!

“O futuro não é determinado pela Universidade na qual vocês se formam, mas sim por vocês e pela maneira como agem como seres humanos. Sabemos que o simples fato de se formar em uma Universidade de prestígio não assegura uma vida feliz. Não é verdade também que a formação em ma Universidade de segunda ou terceira categoria indique fracasso na vida. Tudo se resume na seguinte chave: as pessoas que vencem os desafios que elas próprias lançaram são vencedores e vivem felizes.” (IKEDA, 2008, p. 127)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Exemplar de <i>Ischnocnema holti</i>	11
Figura 2 – Macho de <i>Ischnocnema holti</i> vocalizando.....	11
Figura 3 – Mapa da distribuição geográfica dos indivíduos analisados.....	12
Figura 4 – Árvore filogenética do método de NJ/MP (16S+COI).....	18
Figura 5 – Árvore filogenética do método de NJ (16S).....	19
Figura 6 – Árvore filogenética do método de MP (16S).....	20
Figura 7 – Árvore filogenética do método de NJ (COI).....	21
Figura 8 – Árvore filogenética do método de MP (COI).....	22
Figura 9 – Árvore filogenética do método de NJ (16S+COI).....	23
Figura 10 – Árvore filogenética do método de MP (16S+COI).....	24
Figura 11 – Mapa da distribuição geográfica dos clados genéticos identificados.....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Amostragem dos indivíduos e suas localidades.....	13
Tabela 2 – Amostragem dos indivíduos e seus clados.....	16
Tabela 3 – Valores de distância de COI intra clado.....	25
Tabela 4 – Valores de distância de 16S intra clado.....	26
Tabela 5 – Valores de distância de COI inter clado.....	26
Tabela 6 – Valores de distância de 16S inter clado.....	27

RESUMO

Entre os diferentes ambientes da Mata Atlântica as áreas de maior altitude são o hábitat de algumas espécies de anfíbios anuros. Tais espécies devem ser investigadas, pois ambientes montanhosos e acidentados podem propiciar barreiras à dispersão de diversos anuros, podendo fazer com que cada população passe por processos independentes de evolução, podendo levar à especiação. *Ischnocnema holti* é um exemplo de espécie que encontra-se em áreas de altitude da Mata Atlântica. Trabalhos anteriores revelam que há divergência genética entre amostras de diferentes localidades em que tal espécie habita, onde muitas vezes existe uma confusão de identificação com *I. lactea*. Este estudo utilizou marcadores moleculares para estimar a divergência genética entre as populações atribuídas à espécie em estudo nas diferentes áreas de altitude em que esta se encontra, buscando-se contribuir à compreensão de como barreiras geográficas por altitude poderiam interferir nos padrões de diversidade desta região, além de esclarecer o conflito de identificação. Dentro do complexo de espécies *I. lactea/holti* observou-se sete clados genéticos que podem ser novas espécies. Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que os espécimes incluídos no clado II correspondem à espécie *Ischnocnema holti* e sua distribuição restringe-se à parte alta da Serra do Itatiaia, no município de Itamonte, estado de Minas Gerais. Já os exemplares dos clados I, III, IV, V, VI e VII provavelmente não correspondem à espécie *I. holti*, fazendo-se necessária uma maior amostragem para estabelecer em definitivo as relações e os limites específicos neste complexo de espécies. Para melhor entendimento deste complexo é necessária uma revisão taxonômica, sendo indispensáveis estudos com base em aspectos morfológicos, bioacústicos, ecológicos e genéticos (incluindo genes nucleares), procurando explicações, por exemplo, comportamental, evolutiva e filogeográfica para de fato concluir sobre possíveis novas espécies.

Palavra- chave: Diversidade genética. Filogeografia. *Ischnocnema*. Marcadores moleculares.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	09
2 METODOLOGIA	12
2. 1. Amostras analisadas.....	12
2. 2. Extração de DNA e obtenção das sequências.....	14
2. 3. Análise de dados.....	15
3 RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	16
4 CONCLUSÃO.....	29
REFERÊNCIAS	30

1 INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica possui uma grande diversidade de organismos e por isso é considerada um "hotspot" mundial de biodiversidade (MYERS et al., 2000) que, por sua vez, está constantemente sendo ameaçada por muitos fatores antrópicos, principalmente pelo desmatamento (GALINDO-LEAL; CÂMARA, 2005). Por consequência, é considerada uma das áreas de alta prioridade para a conservação da biodiversidade (MYERS, 1988).

As florestas tropicais possuem a maior diversidade de espécies de anfíbios anuros conhecidas atualmente (DUELLMAN, 1999; HEYER et al., 1990; BERTOLUCI, 1998). Somente na Mata Atlântica ocorrem cerca de 460 espécies de anuros, que correspondem a cerca de 20% das espécies da América do Sul (HADDAD et al., 2008; FROST, 2011). Entre estas espécies encontra-se grande número de espécies endêmicas deste bioma (DUELLMAN, 1999). Entre os diferentes ambientes da Mata Atlântica as áreas de maior altitude são o hábitat de muitos anfíbios anuros. Tais espécies devem ser investigadas (HADDAD; ABE, 1999), pois tais ambientes montanhosos e acidentados podem propiciar barreiras à dispersão de diversos anuros, podendo fazer com que cada população passe por processos independentes de evolução (ANDRADE, 2010), podendo levar à especiação. O levantamento da anurofauna neste tipo de ambiente tem demonstrado a existência de diversas espécies novas, raras e endêmicas (GIARETTA; AGUIAR JR, 1998).

Além do levantamento de espécie, a genética molecular tem proporcionado muitas técnicas de acesso à variabilidade genética dentro e entre as populações, tanto através de polimorfismos de proteínas quanto DNA (AVISE, 1994). Os estudos envolvendo sequências de DNA se converteram em excelentes ferramentas para auxiliar na taxonomia e conservação de diversas espécies e também revolucionaram a investigação da história evolutiva das populações (EIZIRIK, 1996). O DNA pode carregar consigo o registro de processos, como a fragmentação geográfica, fenômenos de vicariância e processos de dispersão (KALINOWSKI, 2004).

Marcadores genéticos ou moleculares são caracteres herdáveis com múltiplos estados para cada caráter (SUNNUCKS, 2000). Tais marcadores têm sido utilizados em diversos estudos biológicos como genética de populações, reconstruções filogenéticas, mapeamento genético, entre outras aplicações (SCHLOTTERER,

2004). Assim, o uso dos mesmos marcadores, principalmente aqueles polimórficos, permite o acesso à variabilidade de qualquer indivíduo, contribuindo imensamente para a nossa compreensão sobre o surgimento das espécies (TOMÉ, 2011).

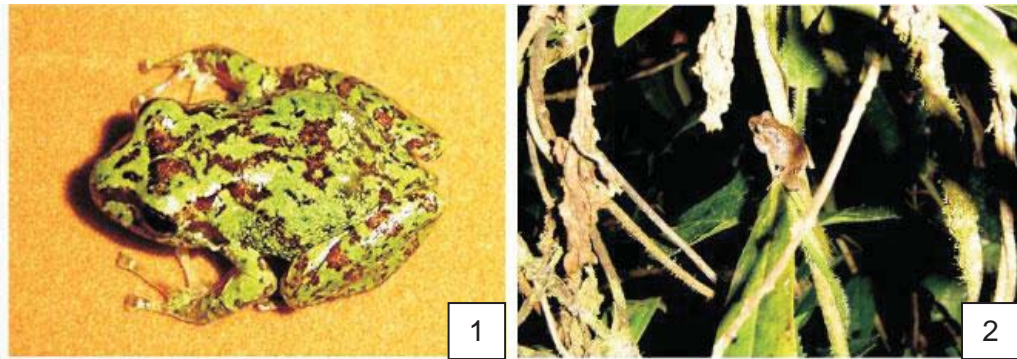
A filogeografia é a disciplina que investiga os processos demográficos que modelam as distribuições geográficas das linhagens, sejam estas pertencentes a uma espécie ou a várias espécies próximas (AVISE, 2000; HEWITT, 2006). Estudos filogeográficos nos permitem compreender como ocorreu a diversificação em grupos de espécies aparentadas e quais os mecanismos responsáveis pelo surgimento de tantas espécies em ambientes diversificados, além de permitir testar a eficiência da classificação taxonômica vigente no grupo estudado. Conseqüentemente, estes estudos são especialmente relevantes para a Mata Atlântica, que carece desse tipo de informação para um melhor planejamento dos esforços de conservação.

O genoma mitocondrial dos vertebrados (mtDNA) tem-se mostrado muito útil para tais estudos. O DNA mitocondrial é uma molécula circular, composta por 37 genes codificadores (13 genes que codificam proteínas relacionadas ao metabolismo mitocondrial, 22 RNA de transferência e 2 rRNA) e uma região controle não-codificadora (AVISE et al., 1986), além de ser altamente polimórfico e possuir alta taxa de mutação (STOLZ, 2006), de ser uma herança predominantemente materna, apresentar um modo de herança sem recombinação e evoluir rapidamente (AVISE et al., 1987).

O gênero *Ischnocnema* Reinhardt e Lütken (1862) (Brachycephalidae), atualmente, compreende 32 espécies distribuídas na região leste do Brasil e ao norte da Argentina (CANEDO et al., 2012; CANEDO; HADDAD, 2012). Tais espécies estão organizadas em quatro séries: *Ischnocnema guentheri*, *Ischnocnema lactea*, *Ischnocnema parva* e *Ischnocnema verrucosa* (CANEDO; HADDAD, 2012). A série *lactea* é composta por 10 espécies: *I. concolor*, *I. gehrti*, *I. holti*, *I. lactea*, *I. melanopygia*, *I. nigriventris*, *I. paranaenses*, *I. randorum*, *I. spanios* e *I. vizottoi*.

Ischnocnema holti foi descrita por Cochran (1948). Targino & Carvalho (2008) publicaram uma redescrição da espécie, restringindo sua ocorrência ao Parque Nacional do Itatiaia, entre 2000 e 2400m de altitude, embora seu canto possa ser ouvido a partir da localidade da Garganta do Registro a 1670 m de altitude. Costa et. al. (2008) expandiram a distribuição geográfica desta espécie, registrando sua ocorrência para Teresópolis, no estado do Rio de Janeiro. Espécimes de identificação dúbia e morfologicamente similares a esta espécie

podem ser encontrados também em outras áreas de altitude da Mata Atlântica do Sudeste brasileiro (C. Canedo, com. pess.).



Figuras 1 e 2 - (1) Exemplar de *Ischnocnema holti* com coloração verde com manchas marrons; (2) macho de *Ischnocnema holti* vocalizando em arbusto dentro da mata de araucárias, no Parque Nacional de Itatiaia, 2100m de altitude, à noite, com saco vocal inflado aparente. **Fonte:** (TARGINO; CARVALHO, 2008.)

Canedo e Haddad (2012) fizeram o primeiro trabalho de filogenia molecular com várias espécies do gênero *Ischnocnema*, sendo que *I. holti* não foi recuperado como monofilético, destacando a necessidade de estudos com foco em sua taxonomia.

O presente estudo teve como objetivo estudar a diversidade genética das populações atribuídas à espécie *Ischnocnema holti* em diferentes áreas de altitude do Sudeste do Brasil.

2. METODOLOGIA

2.1. Amostras analisadas

Foram analisados 32 tecidos de exemplares da espécie *Ischnocnema holti*, populações afins e espécies do grupo externo, em algumas localidades dos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Espírito Santo (Tabela 1). Dentre tais amostras 23 indivíduos foram recuperados do trabalho de Canedo & Haddad e nove novas populações foram adicionadas ao grupo. Os exemplares estão depositados nas coleções zoológicas do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUZP), Coleção de Anfíbios CFBH (Célio Haddad, UNESP de Rio Claro) e Museu Nacional (MNRJ, Rio de Janeiro); todo estavam preservados em etanol 100% em freezer -20°C. Para a análise foram utilizadas sequências de 16S e COI de todas as espécies. Foram analisados cinco exemplares identificados como *I. holti*, quatro como *I. cf. holti* e três como *I. aff. holti*, provenientes do Caparaó, MG; Campos do Jordão, SP; Piquete, SP; Teresópolis, RJ; Itatiaia, RJ e principalmente de Itamonte, MG. Também foram incluídos nas análises indivíduos da espécie *Ischnocnema lactea* encontrados nos clados I, III e IV. As espécies *Ischnocnema* sp., *Ischnocnema spanios*, *Ischnocnema randorum* e *Ischnocnema manezinho* foram utilizadas como grupo externo nas análises. A Figura 3 mostra a distribuição geográfica das amostras analisadas.

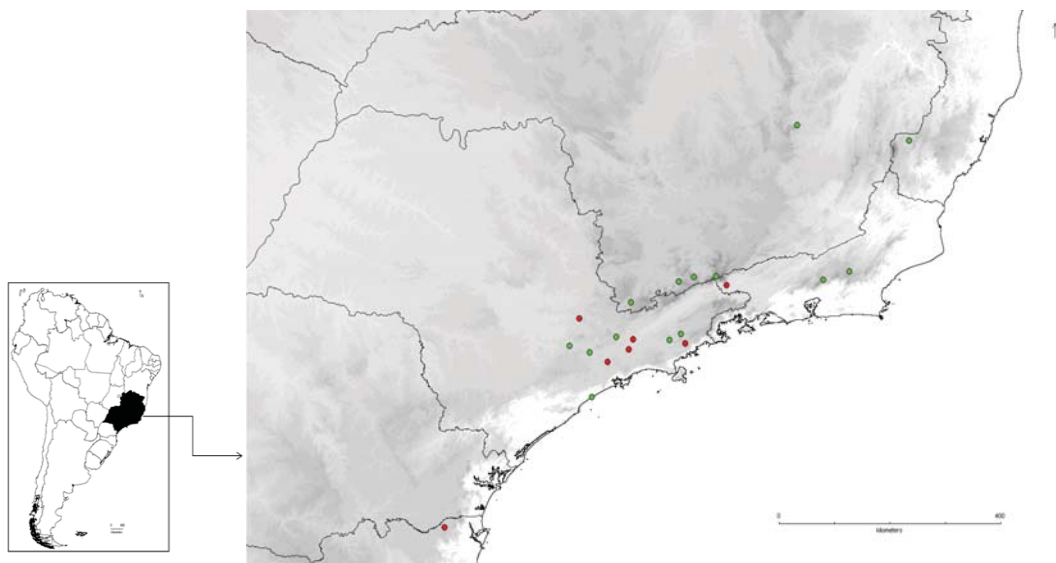


Figura 3 - Mapa da distribuição geográfica dos espécimes analisados. Em verde

estão as amostras o complexo de espécies de *Ischnocnema lactea/holti* e os grupos externos estão em vermelho.

Tabela 1 - Amostragens dos indivíduos analisados e suas respectivas localidades. * novas populações incluídas no trabalho.

	Espécie	Coleção	CFBHT	Extração	Localidade
1	<i>Ischnocnema</i> sp. gr. <i>lactea</i> *	CFBHT	5506	A820	Itanhaém, SP
2	<i>Ischnocnema holti</i> *	CFBHT	10781	A821	Itatiaia, RJ
3	<i>Ischnocnema</i> sp. gr. <i>lactea</i> *	CFBHT	13639	A823	Santo André, SP
4	<i>Ischnocnema</i> gr. <i>lactea</i> *	CFBHT	14593	A824	Santo André, SP
5	<i>Ischnocnema lactea</i>	USP-T	CX 68 ST 33	CC 112	Paranapiacaba, SP
6	<i>Ischnocnema</i> cf. <i>holti</i>	USP-T	CX 80 ST 41	CC 126	Boracéia, SP
7	<i>Ischnocnema lactea</i>	USP-T	CX 82 ST 11	CC 177	Caucaia do Alto, SP
8	<i>Ischnocnema lactea</i>	CFBHT	10499	CC 181	Itanhaém, SP
9	<i>Ischnocnema lactea</i>	CFBHT	11170	CC 197	Bertioga, SP
10	<i>Ischnocnema</i> cf. <i>lactea</i>	MZUSP	800	CC 200	Paranapiacaba, SP
11	<i>Ischnocnema</i> cf. <i>lactea</i>	MZUSP	807	CC 206	Paranapiacaba, SP
12	<i>Ischnocnema</i> cf. <i>lactea</i>	CFBHT	4459	CC 039	Santa Virgínia, SP
13	<i>Ischnocnema</i> cf. <i>lactea</i>	MZUSP	933	CC 208	Cantareira, SP
14	<i>Ischnocnema holti</i> *	CFBHT	2433	A819	Itamonte, MG
15	<i>Ischnocnema holti</i> *	CFBHT	10783	A822	Itamonte, MG
16	<i>Ischnocnema holti</i>	CFBHT	10779	CC 100	Itamonte, MG
17	<i>Ischnocnema holti</i>	CFBHT	10783	CC 108	Itamonte, MG
18	<i>Ischnocnema</i> gr. <i>lactea</i> *	MNRJ	MNRJ55003	A827	Catas Altas, MG
19	<i>Ischnocnema</i> gr. <i>lactea</i> *	CFBHT	646	A818	Camanducaia, MG
20	<i>Ischnocnema</i> aff. <i>holti</i>	USP-T	CX 84 ST 47	CC 175	Campos do Jordão, SP
21	<i>Ischnocnema</i> aff. <i>holti</i>	CFBH-T	11641	CC 205	Piquete, SP
22	<i>Ischnocnema</i> aff. <i>holti</i>	USP-T	CX 75 ST 72	CC 209	Campos de Jordão, SP
23	<i>Ischnocnema</i> cf. <i>holti</i> *	MNRJ	MNRJ57308	A826	Nova Friburgo, RJ
24	<i>Ischnocnema</i> cf. <i>holti</i>	USP-T	CX 71 ST 33	CC 224	Caparaó, MG
25	<i>Ischnocnema</i> cf. <i>holti</i>	CFBH-T	12364	CC 211	Teresópolis, RJ
26	<i>Ischnocnema</i> sp.	CFBHT	10785	CC 105	Itatiaia, RJ
27	<i>Ischnocnema spanios</i>	USP-T	CX 84 ST 60	CC 118	Mogi das Cruzes, SP
28	<i>Ischnocnema</i> cf. <i>randorum</i>	USP-T	CX 88 ST 73	CC 122	Piedade, SP
29	<i>Ischnocnema</i> sp.	USP-T	CX 128 ST 80	CC 138	Santo André, SP
30	<i>Ischnocnema</i> cf. <i>spanios</i>	MZUSP	741	CC 202	Paranapiacaba, SP
31	<i>Ischnocnema manezinho</i>	CFBHT	3237	CC 051	São Bento do Sul, SC
32	<i>Ischnocnema</i> sp. gr. <i>lactea</i>	CFBHT	3827	CC 074	Caraguatatuba, SP

2.2. Extração de DNA e obtenção das sequências

A extração do DNA total das novas amostras obtidas foi realizada com o kit de extração de DNA DNeasy (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante. Em linhas gerais a extração consistiu em realizar a digestão do tecido em solução com proteinase K e a lise das células para liberação do DNA na solução, em seguida a solução foi transferida para uma coluna de sílica e o material foi centrifugado. Após duas fases de lavagem o DNA foi purificado e ressuspendido em 100 μ l de solução Tris-EDTA 1X.

Após a extração, dois seguimentos do DNA mitocondrial (mtDNA) foram selecionados para amplificação e sequenciamento: um fragmento de \pm 650 pb do gene Citocromo Oxidase C subunidade I (COI) e um fragmento do RNA ribossomal 16S (16S) de \pm 500pb. Foram obtidos fragmentos de COI para todas as amostras e 16S para as amostras que foram extraídas nesse trabalho. Para as outras amostras obtivemos as sequências de 16S já disponíveis do trabalho de Canedo & Haddad (2012).

Os dois fragmentos foram amplificados nas mesmas condições de reação de PCR. A reação foi realizada em volume de 12 μ l (1,25 μ l de buffer, 0,5 μ l de Mg^{++} , 0,5 μ l de cada primer -10mM, 8,7 μ l de água, 0,12 μ l de taq polimerase e 1 μ l de DNA extraído). Para todas as amplificações, a reação foi conduzida com 1 ciclo inicial de 60s a 94°C, seguidos de 35 ciclos de amplificação (94°C por 30s, 50 °C por 30 s, 72°C por 60s), com uma fase final de extensão a 72° C por 3 min.

Os resultados das amplificações foram analisados em gel agarose 1% para verificar a concentração e confirmar o tamanho dos fragmentos obtidos.

Os fragmentos da PCR foram sequenciados utilizando-se o kit BigDye 3.1 A reação de sequenciamento foi purificada por precipitação em EDTA/etanol e o sequenciamento automático foi realizado no seqüenciador ABI 3500 do Centro de Estudo de Insetos Sociais (CEIS), UNESP, Rio Claro. Os eletroferogramas resultantes do sequenciamento foram analisados visualmente para verificar a qualidade e as sequências obtidas com os “primers” direto e reverso de um mesmo fragmento, que foram convertidas em um único “*contig*” no programa CODONCODE Aligner v. 2.0.4 (CodonCode Corporation, Dedham, Massachusetts, EUA).

2.3. Análise dos dados

As análises foram conduzidas no programa MEGA 4.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (TAMURA et al., 2007). Neste programa as sequencias foram alinhadas utilizando-se ClustalW (THOMPSON et al., 1994) e foram estimadas as distâncias genéticas entre os indivíduos e espécies e as árvores filogenéticas para visualização dos agrupamentos. Para a elaboração das árvores foram empregados dois métodos: *Neighbor- Joining* (NJ) e máxima parcimônia (*Maximum Parsimony*, MP). O teste de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985) foi empregado utilizando 1000 réplicas para cada método. Este teste é utilizado para dar suporte aos clados obtidos nas árvores filogenéticas. Para os métodos NJ foi utilizado o modelo evolutivo Kimura 2-parametros (K2P) (KIMURA, 1980), para o método MP o modelo utilizado foi o tree by random addition (TRB).

3 RESULTADOS e DISCUSSÃO

Foram obtidas sequências dos dois fragmentos gênicos para todos os indivíduos selecionados. Para o estudo utilizou-se 591pb das sequências de COI e 277pb das sequências de 16S.

Dentro do complexo de espécies *I. lactea/holti*, observou-se sete clados que podem ser interpretados como populações dentro da espécie ou possíveis novas espécies. A figura 4 apresenta a árvore filogenética utilizando o método NJ/MP com sequências de 16S+COI, onde ficam evidenciadas tais agrupamentos e a Tabela 2 demonstra a posição de cada indivíduo dentro de cada clado.

Em sequência, as figuras 5-10 apresentam o resultado de todas as árvores propostas. Respectivamente, utilizando o método NJ e MP com sequências de 16S (Figuras 5 e 6), utilizando o método NJ e MP com sequências de COI (Figuras 7 e 8) e por fim utilizando o método NJ e MP com sequências de 16S+COI (Figuras 9 e 10).

As árvores geradas pelos diferentes métodos utilizados nas análises, NJ e MP e pelos diferentes genes, COI e 16S, possuem topologia semelhantes, diferindo apenas nos valores de *bootstrap*.

Tabela 2 - Amostragens dos indivíduos analisados, suas respectivas localidades e clados a que pertencem.

	Espécie	Extração	Localidade	Clado
1	<i>Ischnocnema</i> sp. gr. <i>lactea</i>	A820	Itanhaém, SP	I
2	<i>Ischnocnema holti</i>	A821	Itatiaia, RJ	I
3	<i>Ischnocnema</i> sp. gr. <i>lactea</i>	A823	Santo André, SP	I
4	<i>Ischnocnema</i> gr. <i>lactea</i>	A824	Santo André, SP	I
5	<i>Ischnocnema lactea</i>	CC 112	Paranapiacaba, SP	I
6	<i>Ischnocnema</i> cf. <i>holti</i>	CC 126	Boracéia, SP	I
7	<i>Ischnocnema lactea</i>	CC 177	Caucaia do Alto, SP	I
8	<i>Ischnocnema lactea</i>	CC 181	Itanhaém, SP	I
9	<i>Ischnocnema lactea</i>	CC 197	Bertioga, SP	I
10	<i>Ischnocnema</i> cf. <i>lactea</i>	CC 200	Paranapiacaba, SP	I
11	<i>Ischnocnema</i> cf. <i>lactea</i>	CC 206	Paranapiacaba, SP	I
12	<i>Ischnocnema</i> cf. <i>lactea</i>	CC 039	Santa Virgínia, SP	I

13	<i>Ischnocnema</i> cf. <i>lactea</i>	CC 208	Cantareira, SP	I
14	<i>Ischnocnema holti</i>	A819	Itamonte, MG	II
15	<i>Ischnocnema holti</i>	A822	Itamonte, MG	II
16	<i>Ischnocnema holti</i>	CC 100	Itamonte, MG	II
17	<i>Ischnocnema holti</i>	CC 108	Itamonte, MG	II
18	<i>Ischnocnema</i> gr. <i>lactea</i>	A827	Catas Altas, MG	III
19	<i>Ischnocnema</i> gr. <i>lactea</i>	A818	Camanducaia, MG	IV
20	<i>Ischnocnema</i> aff. <i>holti</i>	CC 175	Campos do Jordão, SP	IV
21	<i>Ischnocnema</i> aff. <i>holti</i>	CC 205	Piquete, SP	IV
22	<i>Ischnocnema</i> aff. <i>holti</i>	CC 209	Campos de Jordão, SP	IV
23	<i>Ischnocnema</i> cf. <i>holti</i>	A826	Nova Friburgo, RJ	V
24	<i>Ischnocnema</i> cf. <i>holti</i>	CC 224	Caparaó, MG	VI
25	<i>Ischnocnema</i> cf. <i>holti</i>	CC 211	Teresópolis, RJ	VII

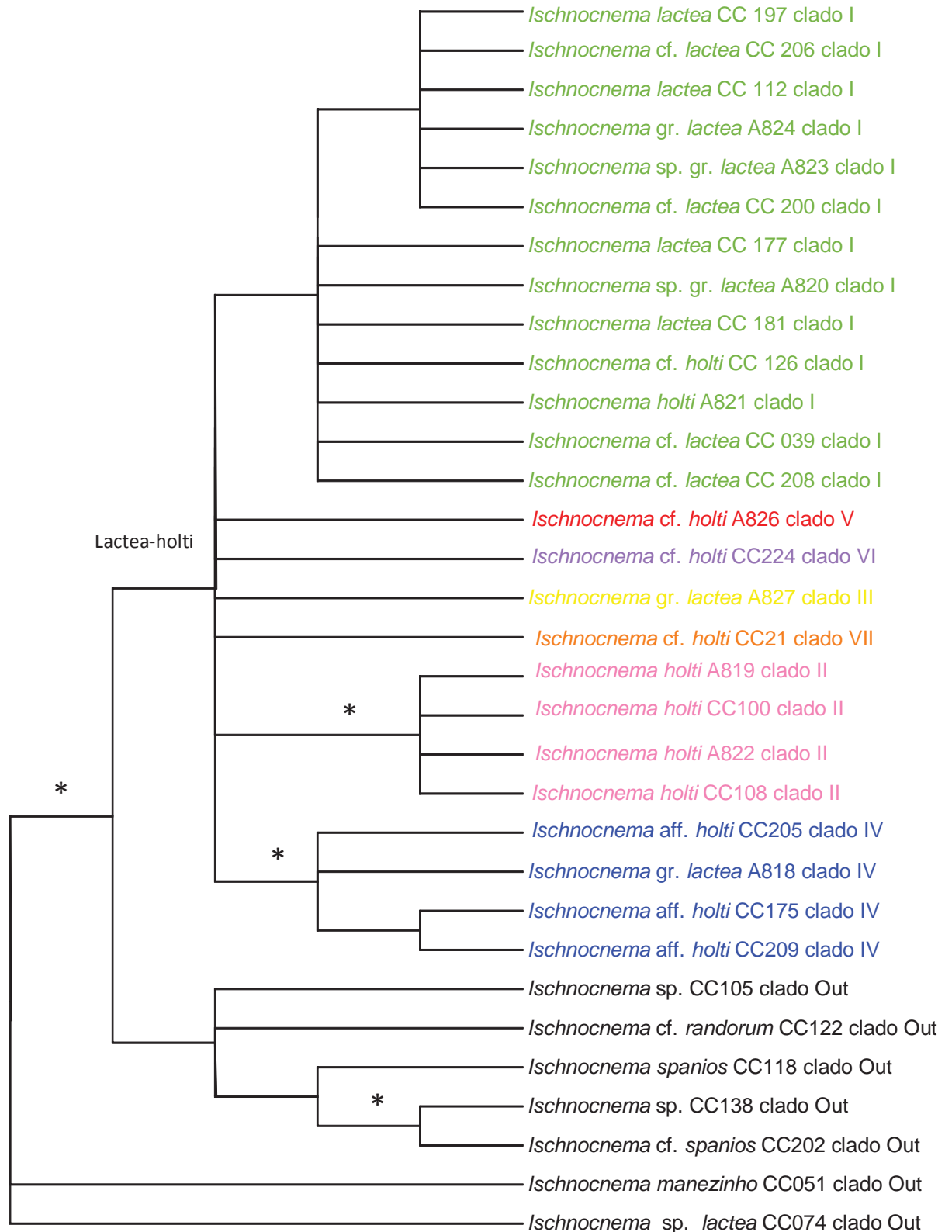


Figura 4 - Árvore filogenética gerada pelo programa MEGA 4.0 utilizando o método NJ/MP com sequências de 16S+COI, evidenciando os principais clados sendo que * > 95%.

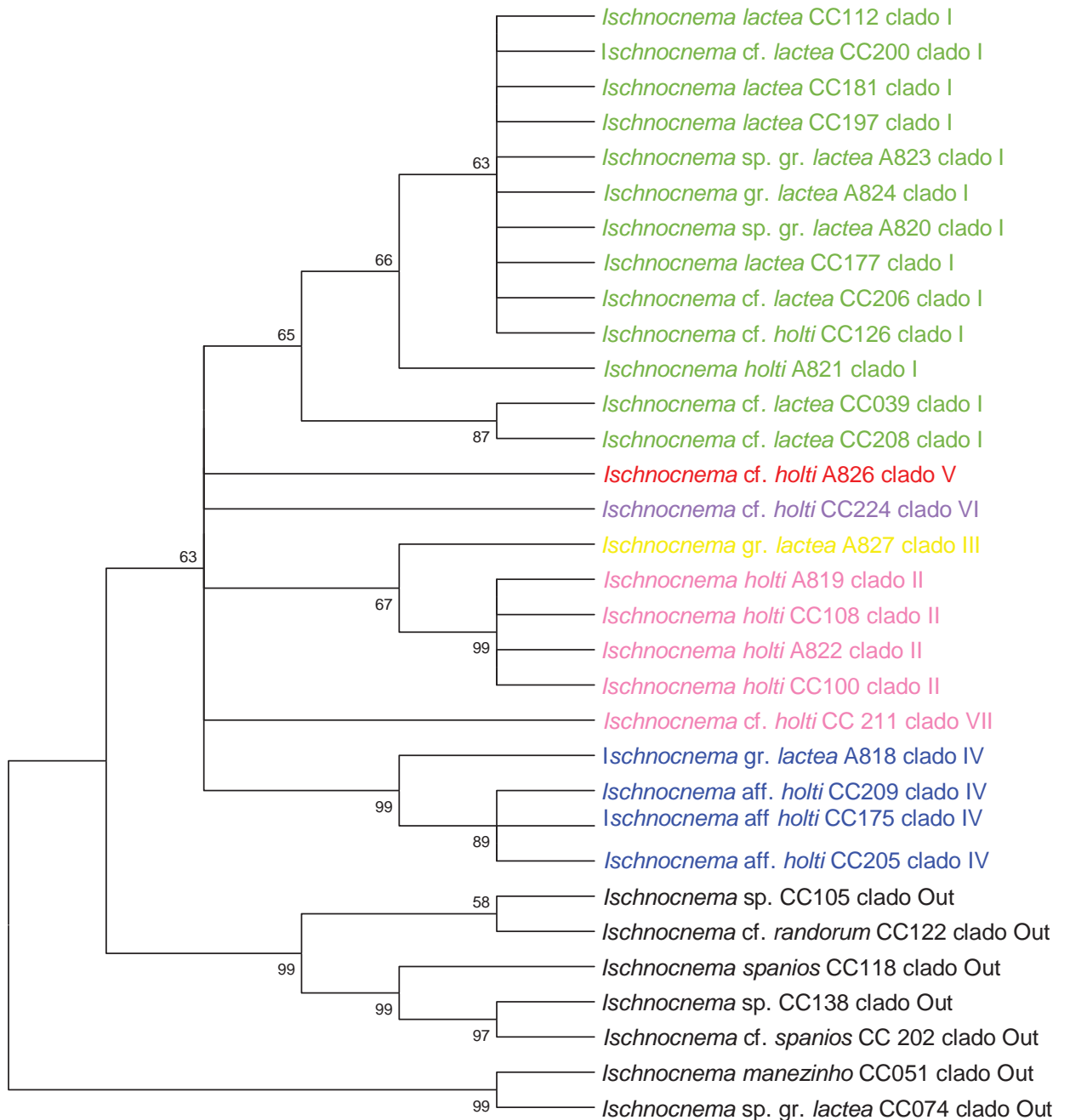


Figura 5 - Árvore filogenética gerada pelo programa MEGA 4.0 utilizando o método NJ com sequências de 16S, evidenciando os principais clados.

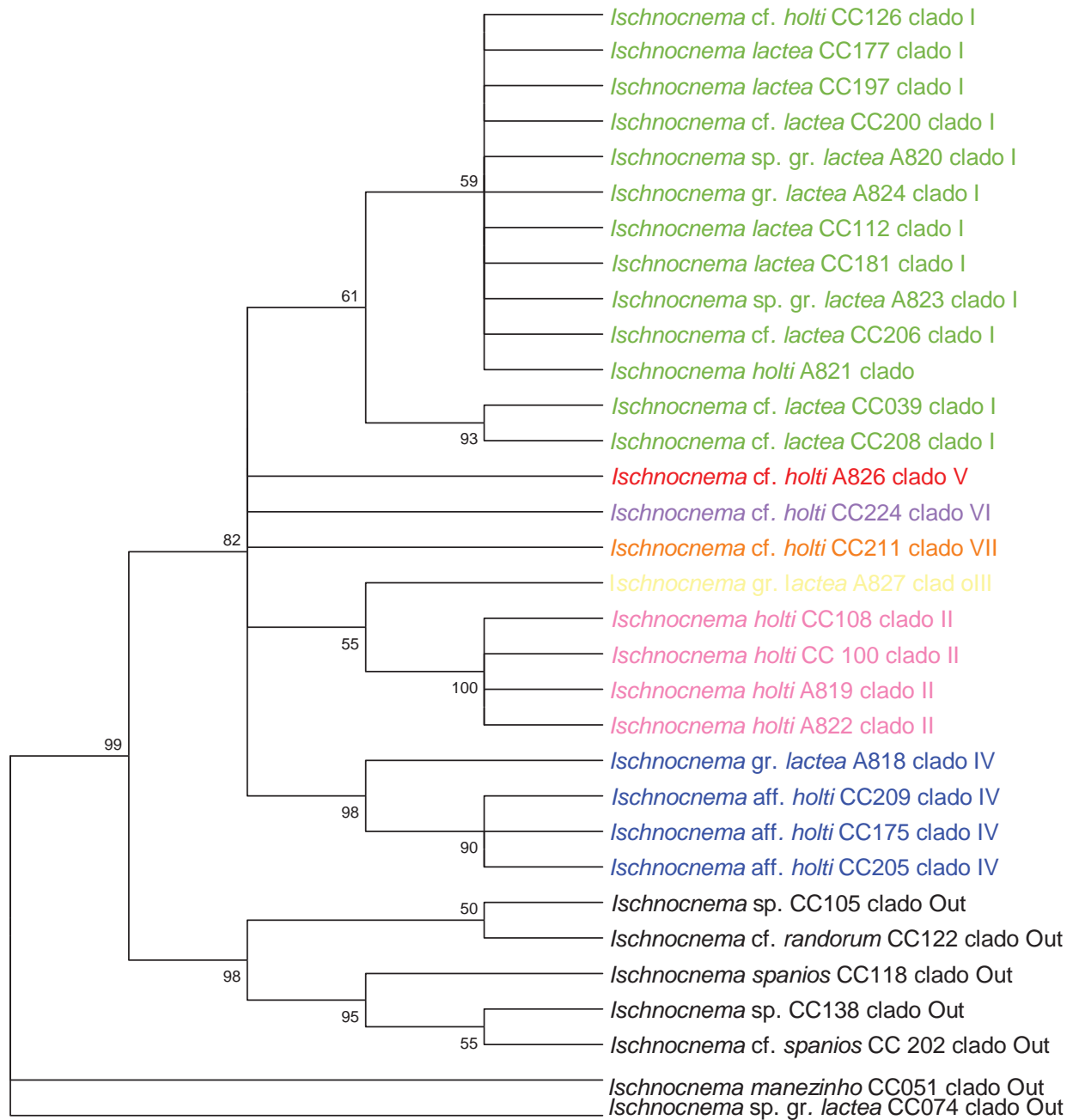


Figura 6 - Árvore filogenética gerada pelo programa MEGA 4.0 Utilizando o método MP com seqüências de 16S, evidenciando os principais clados.

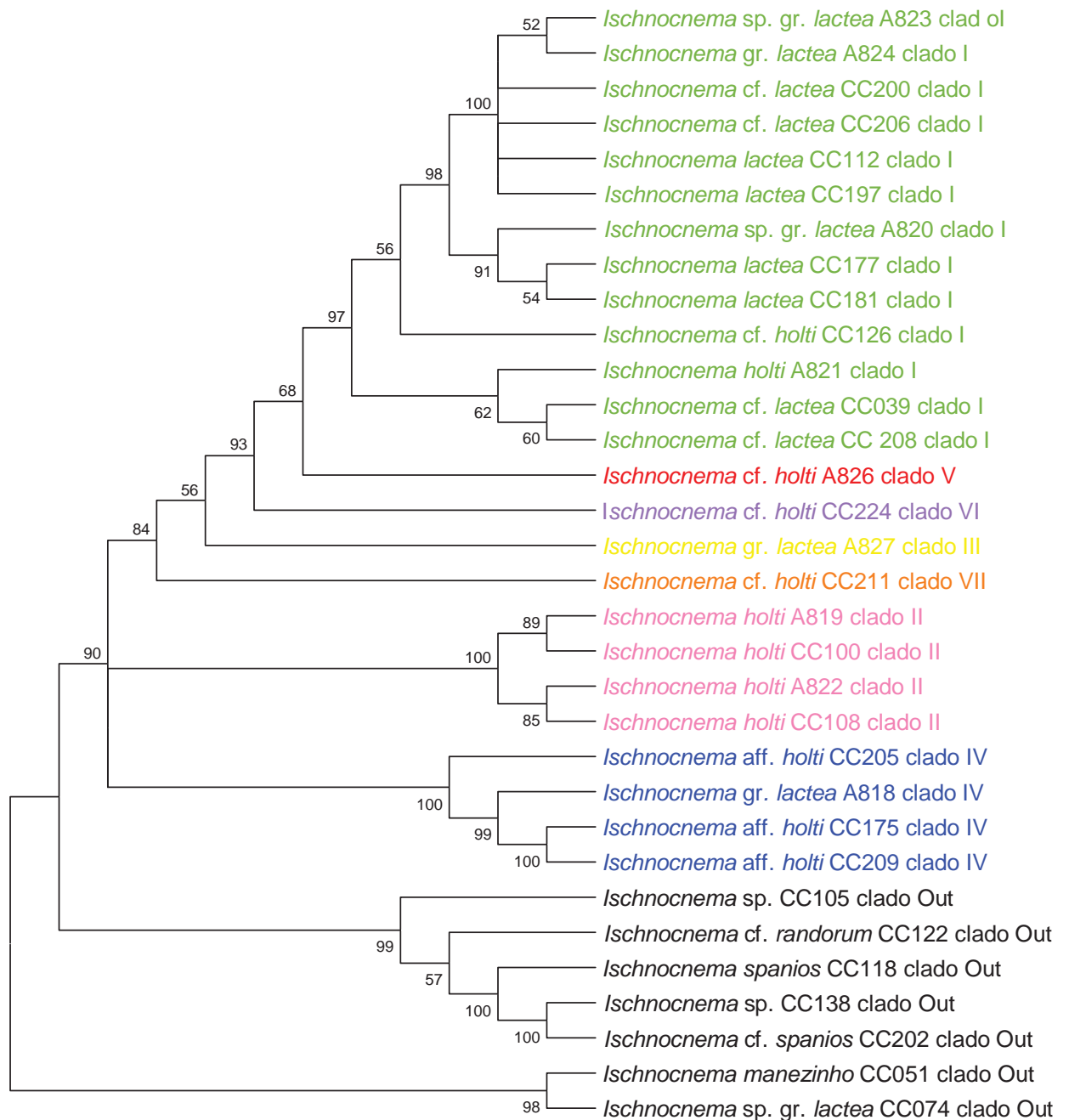


Figura 7 - Árvore filogenética gerada pelo programa MEGA 4.0 utilizando o método de NJ com sequências de COI, evidenciando os principais clados.

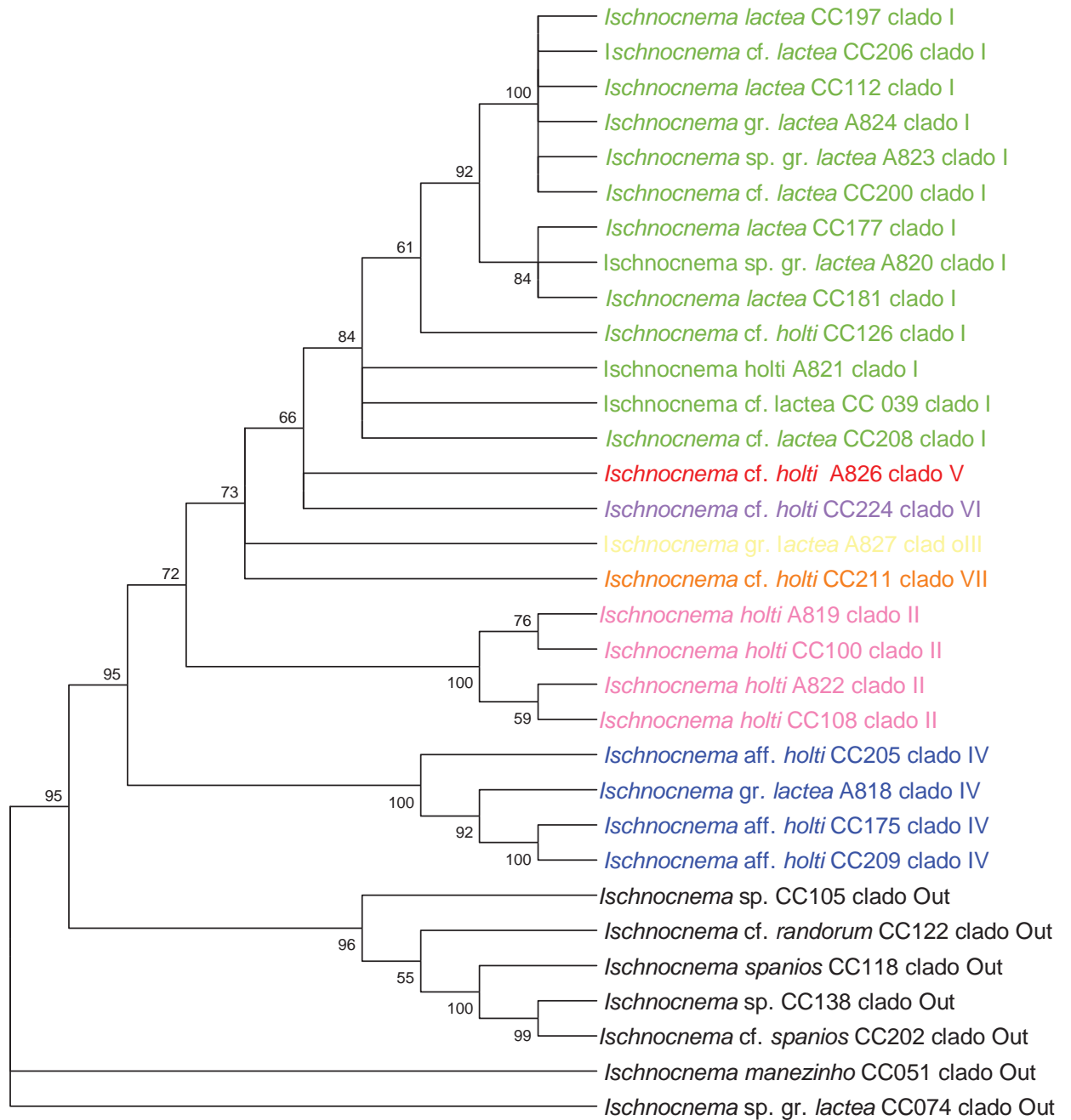


Figura 8 - Árvore filogenética gerada pelo programa MEGA 4.0 utilizando o método de MP com sequências de COI, evidenciando os principais clados.

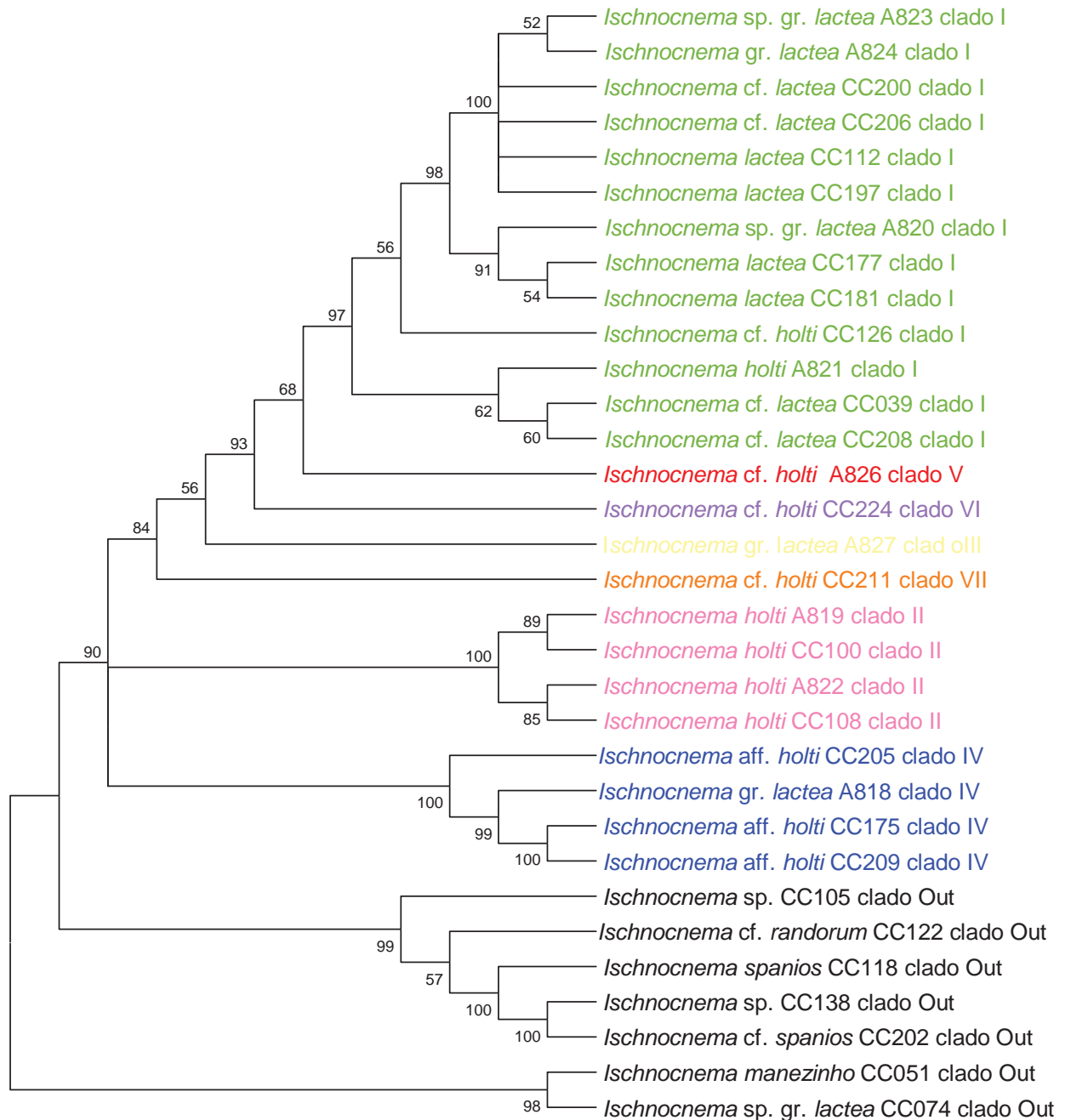


Figura 9 - Árvore filogenética gerada pelo programa MEGA 4.0 utilizando o método de NJ com seqüências de 16S+COI, evidenciando os principais clados.

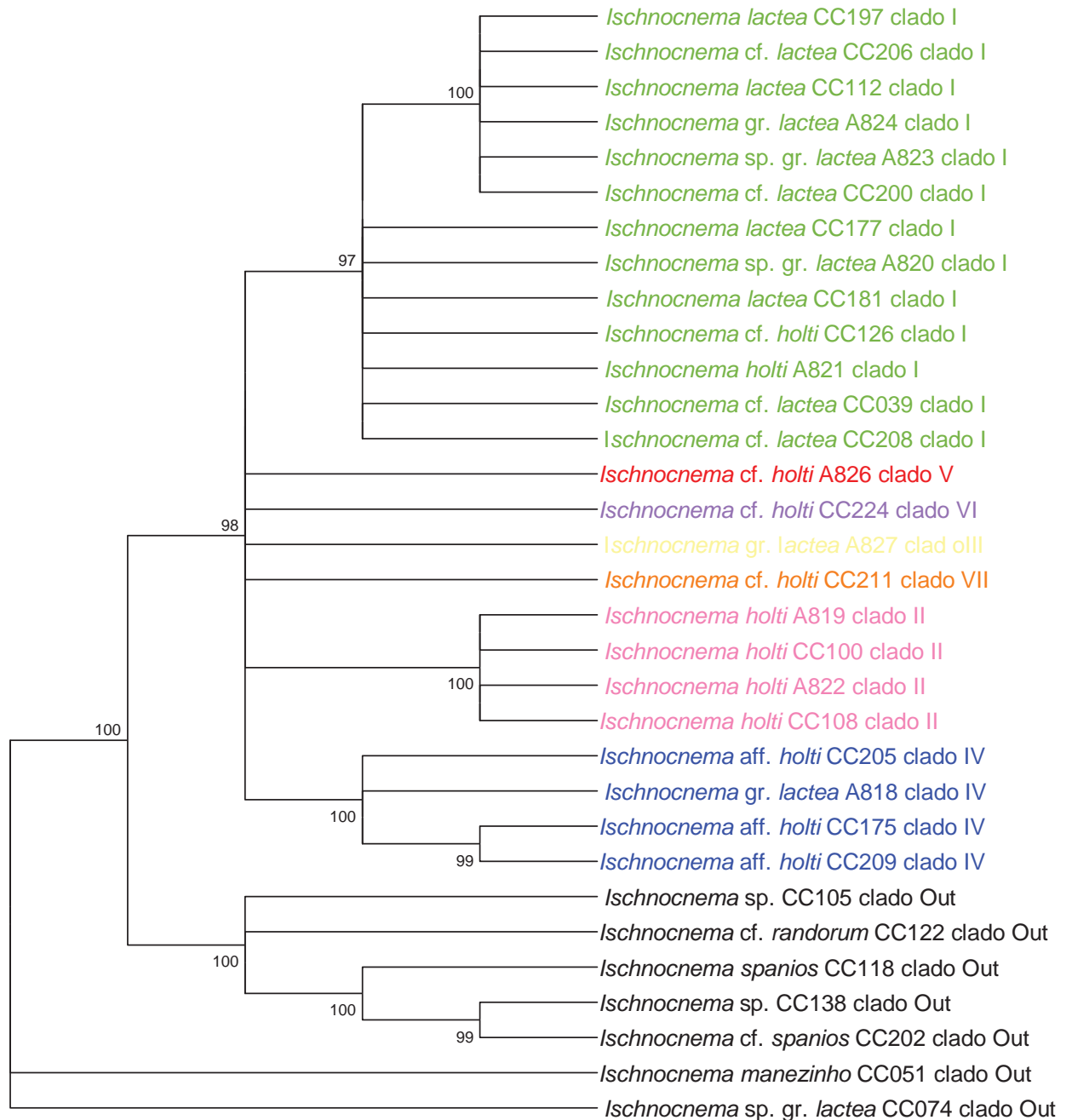


Figura 10 - Árvore filogenética gerada pelo programa MEGA 4.0 utilizando o método de MP com sequências de 16S+COI, evidenciando os principais clados.

A existência de espécies que não são monofiléticas em sua estrutura mitocondrial tem sido extensivamente observada em muitos grupos de animais (FUNK; OMLAND, 2003). Analisando estas árvores, podemos observar que as mesmas recuperam a árvore do recente trabalho de Canedo e Haddad (2012), com um aumento no número de espécies, confirmando o resultado de não monofilia da espécie *I. holti*.

O clado I é o que apresenta maior distribuição geográfica e maior amostragem, totalizando 13 indivíduos espalhados pela Serra do Mar no estado de São Paulo e apenas um indivíduo da Serra da Mantiqueira, em Itatiaia, no estado do Rio de Janeiro. Este clado possivelmente corresponde a *I. lactea*.

O clado II corresponde a *I. holti*, pois sua localização está de acordo com a localidade e altitude correspondentes a sua redescoberta (TARGINO; CARVALHO, 2008).

Os cladogramas III, V, VI e VII, apresentam-se separados de *I. holti* nas árvores filogenéticas e correspondem a possíveis espécies novas. Porém, cada um deles é representado por uma única espécie sendo necessário nestes casos um aumento amostral para confirmar os resultados obtidos.

Por fim, o clado IV também não corresponde a nenhuma espécie nominal. Este clado é bem suportado e provavelmente representa uma nova espécie.

Nas hipóteses filogenéticas apresentadas, *Ischnocnema holti* e *I. lactea* estão divididos em sete diferentes cladogramas, sendo que quatro deles apresentam apenas um indivíduo. A relação entre estes cladogramas não pode ser definida com base nos marcadores e análises utilizados.

Os valores de divergência de 16S foram menores comparados com COI.

Analisando os cladogramas com mais do que um indivíduo foi possível estimar a variação intra grupo. Verificamos que esta variação é sempre menor que entre grupos (Tabela 3 e 4).

O clado I apareceu com a maior divergência no fragmento de COI (4,3%), precedido do clado IV (3,2%). O clado II apareceu com uma divergência muito pequena de apenas 0,4%. Analisando o fragmento de 16S, nota-se que os resultados diminuem drasticamente. Mesmo assim, os cladogramas I e IV ainda aparecem com os maiores valores de divergência.

Tabela 3 - Valores de distância pareada K2P de COI intra clado.

	Divergência intra clado	Erro
Clado I	0,043	0,005
Clado II	0,004	0,002
Clado III	n/c	n/c
Clado IV	0,032	0,005
Clado V	n/c	n/c

Clado VI	n/c	n/c
Clado VII	n/c	n/c
OUT	0,19	0,014

Tabela 4 - Valores de distância pareada K2P de 16S intra clado.

	Divergência intra clado	Erro
Clado I	0.008	0.002
Clado II	0.000	0.000
Clado III	n/c	n/c
Clado IV	0.009	0.004
Clado V	n/c	n/c
Clado VI	n/c	n/c
Clado VII	n/c	n/c
OUT	0.097	0.013

Analisando os valores de divergência inter clado de COI (Tabela 5) e 16S (Tabela 6) observa-se grande diferença entre COI e 16S. Isso acontece, pois o fragmento de 16S é consideravelmente menor que o de COI, além de serem fragmentos que evoluem diferentemente, sendo que um é RNA ribossomal e o outro é gene codificador.

É possível observar valores altos de divergência, chegando a 20% entre os cladros I e II, V e IV, VI e IV, VII e IV, no fragmento de COI. Embora menores, o fragmento de 16S também demonstrou valores altos de divergência chegando a 8,2% entre os cladros I e IV.

Tabela 5 - Valores de distância pareada K2P de COI inter clado.

	1	2	3	4	5	6	7	8
1								
2	0,20							
3	0,13	0,16						
4	0,19	0,19	0,17					
5	0,11	0,19	0,14	0,20				
6	0,11	0,15	0,13	0,20	0,12			
7	0,17	0,19	0,15	0,20	0,17	0,17		
8	0,25	0,25	0,24	0,25	0,27	0,25	0,26	

Tabela 6 - Valores de divergência (%) de 16S inter clado.

	1	2	3	4	5	6	7	8
1								
2	0,063							
3	0,048	0,038						
4	0,082	0,076	0,064					
5	0,022	0,058	0,042	0,073				
6	0,028	0,055	0,031	0,064	0,023			
7	0,056	0,068	0,047	0,065	0,039	0,047		
8	0,114	0,14	0,122	0,122	0,119	0,114	0,129	

Para compreender melhor os resultados de divergência é necessário definir valores limiares que, idealmente, tornam-se referência para possíveis espécies candidatas.

Vences et al. (2005), sugerem valores limite para anfíbios em torno de 5% de divergência em 16S e 10% de divergência em COI. Fouquet et al. (2007) argumentam o uso de 3% de divergência em 16S para identificar espécies candidatas de anuros neotropicais. Através de seus resultados, Crawford et al. (2010), consideraram ser a mesma espécie quando esta mostrar até 6% divergência no COI ou 1,2% de divergência em 16S.

Portanto, esses valores podem variar conforme grupo e localidade, mas comparando todos esses padrões com os resultados obtidos neste trabalho, observa-se que a divergência entre os clados é maior que todas as sugestões de limite citadas acima, inferindo que cada clado é potencialmente uma espécie diferente.

O grande problema com a definição destes valores é a ampla gama de sobreposição entre valores de divergência intra e interespecíficos, o que parece ser um problema generalizado em anfíbios (VENCES et al., 2005).

As distâncias genéticas encontradas têm relação com a distribuição geográfica (Figura 11). No clado I, que apresenta a maior distância intra grupo, isso pode se confirmar pelo fato de ser o clado mais amplamente distribuído. Este clado merece atenção em futuros trabalhos, pois além dos valores de distância e ampla distribuição geográfica, aparece na árvore filogenética (Figura 4) com populações estruturadas, ou seja, possui uma divisão interna filogenética que está relacionada com suas localizações geográficas. Já o clado II apresenta um valor baixo de

divergência, pois todos os indivíduos encontram-se na mesma localidade. Já o clado IV, possui uma divergência intermediária, assim como sua distribuição geográfica, ou seja, não é muito variada se restringindo bem mais que o clado I.

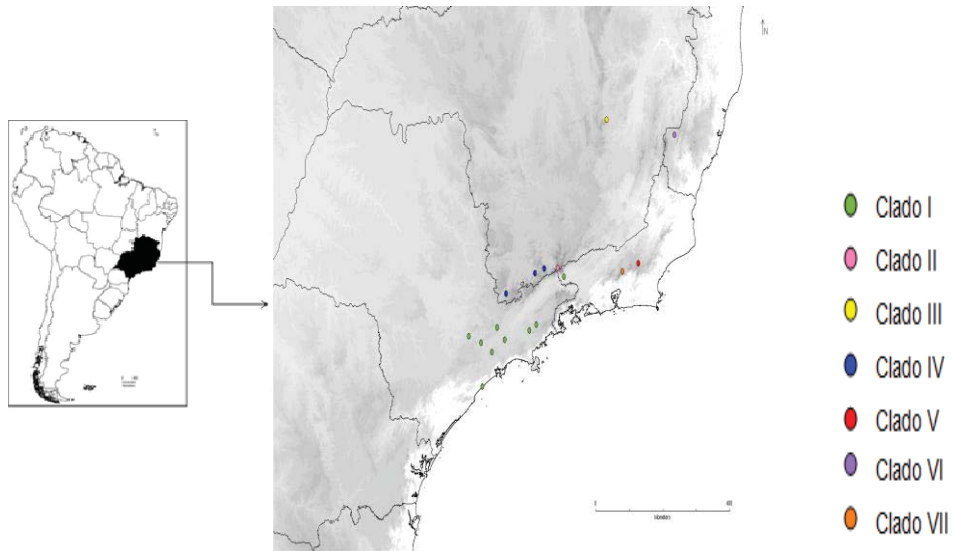


Figura 11 - Mapa da distribuição geográfica dos clados identificados neste estudo.

4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que os espécimes incluídos no clado II correspondem à espécie *Ischnocnema holti* e sua distribuição restringe-se à parte alta da Serra da Mantiqueira, no PARNA do Itatiaia, no município de Itamonte, estado de Minas Gerais.

Os resultados obtidos para os exemplares dos cladogramas I, III, IV, V, VI, VII sugerem que estes grupos provavelmente não correspondem à espécie *I. holti*, fazendo-se necessária uma maior amostragem para estabelecer em definitivo as relações e os limites específicos neste complexo e espécies. Vale ressaltar que estas espécies são difíceis de serem capturadas, por isso o número pequeno de amostras. Para melhor entendimento deste complexo é necessária uma revisão taxonômica, sendo indispensáveis estudos com base em aspectos morfológicos, bioacústicos, ecológicos e genéticos (incluindo genes nucleares), procurando explicações, por exemplo, comportamental, evolutiva e filogeográfica para de fato concluir sobre possíveis novas espécies (JASEN et al., 2011).

Por último, este estudo indica a necessidade de ampliar as pesquisas referentes às espécies que habitam a Mata Atlântica, em especial aquelas que ocupam suas áreas de altitude. Mesmo tendo sido em grande parte destruído, este bioma abriga mais de 8.000 espécies endêmicas de plantas vasculares, anfíbios, répteis, aves e mamíferos (MYERS et al., 2000), o que reforça a necessidade de maior empenho pela sua conservação.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, E. M. B. Especiação sem barreira e padrões de diversidade. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas. 2010.

AVISE, J. C. Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. *Philos.* 1986.

AVISE, J. C. Molecular markers, natural history and evolution. New York: Chapman & Hall. 1994.

AVISE, J. C. Phylogeography: the history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge. 2000.

AVISE, J. C., ARNOLD, R. J., BALL, M., E. BERMINGHAM, LAMB, T., NEIGEL, J. E., REEB, C. A., SAUNDERS, N. C. Intraspecific Phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18, 489–522. 1987.

BERTOLUCI, J. A. Annual patterns of breeding activity in Atlantic Rainforest anurans. *J. Herpetol.*, 32:607-611. 1998.

CANEDO, C., TARGINO, M., LEITE, F. S. F., HADDAD, C. F. B. H. A New Species of *Ischnocnema* (Anura) from the São Francisco Basin Karst Region, Brazil. *Herpetologica* 68:3, 393-400. 2012.

CANEDO, C., HADDAD, C.F.B. Phylogenetic relationships within anuran clade Terrarana, with emphasis on the placement of Brazilian Atlantic rainforest frogs genus *Ischnocnema* (Anura: Brachycephalidae). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 65, pp. 610–620. 2012.

COCHRAN, D. M. A new subspecies of frog from Itatiaya, Brazil. *American Museum Novitates* 1375: 1-3. 1948.

COSTA, P. N., SILVA, S. P. C., SILVA, A. M. P. C., WEBER, L. N. 2008. Amphibia, Anura, Brachycephalidae, *Ischnocnema holti*: Distribution extension. Check List 4(3): 232–233, 2008.

CRAWFORD, A. J., LIPS K. R., BERMINGHAM, E. Epidemic disease decimates amphibian abundance, species diversity, and evolutionary history in the highlands of central Panama. P Natl Acad Sci USA. 2010.

DUELLMAN, W. E. Distribution patterns of amphibians in South America. Pp. 255-328. In: Duellmann, W.E. (Ed.). *Patterns of Distribution of Amphibians: a Global Perspective*. The Johns Hopkins University Press. Baltimore and London. 1999.

EIZIRIK, E. Ecologia molecular, genética da conservação e o conceito das unidades evolutivamente significativas. Braz J Genet 19(Suppl):23–2, 1996.

FELSENSTEIN, J. 'PHYLIP: Phylogeny Inference Package', University of Washington, Seattle, WA. 1993.

FOUQUET, A., GILLES, A., VENCES, M., MARTY, C., BLANC, M., GEMMELL, N. J. Underestimation of species richness in Neotropical frogs revealed by mtDNA analyses. PLoS One. 2007.

FROST, D. R. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.5 (31 January, 2011). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/>. American Museum of Natural History, New York, USA. 2011.

FUNK, D. J., OMLAND, K. E. Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. Annu. Rev. Ecol. Syst. 34, 397–423, 2003.

GALINDO-LEAL, C. G., CAMARA, I. D. Mata Atlântica Biodiversidade, Ameaças e Perspectivas. Conservation International, Belo Horizonte. 2005.

- GIARETTA, A. A., AGUIAR, Jr., O. 1998. A new sepecies of *Megaelosia* from the Mantiqueira Range, Southeastern Brazil. *Journal of Herpetology*, 32(1): 80-83.z
- HADDAD, C. F. B., ABE, A. Anfíbios e Répteis. In: Workshop Floresta Atlântica e Campos Sulinos. http://www.bdt.org.br/workshop/mata.atlantica/BR/rp_anfib. (último acesso 01/05/2006). 1999.
- HADDAD, C. F. B., TOLEDO, L. F., PRADO, C. P. A. Anfíbios da Mata Atlântica. pp 241. Editora Neotropica. São Paulo. 2008.
- HEWITT, G. M. The structure of biodiversity – insights from molecular phylogeography. *Frontiers in Zoology* 1, 4. 2006.
- HEYER, W. R.; RAND, A. S.; CRUZ, C. A. G.; PEIXOTO O. L.; NELSON, C. E. Frogs of Boracéia. *Arq. Zool.*, S. Paulo, 31:231-410.1990.
- IKEDA, D. Diálogo sobre a juventude. Brasil Seikyo. São Paulo, SP. 2008.
- JASEN, M., BLOCH, R., SCHULZE, A., PFENNINGER, M. Integrative inventory of Bolivia's lowland anurans reveals hidden diversity. *Zoologica Scripta*. 2011.
- KALINOWSKI, S. T. Counting alleles with rarefaction: private alleles and hierarchical sampling designs. *Conserv. Genetics* 5: 539-543. 2004.
- KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide equences. *J. Mol. Evol.*, 16, 111-120. . 1980.
- MYERS, N. Threatened biotas: "hot-spots" in tropical rain forests. *Environmentalist* 8: 187-208. 1988.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B. & KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-845. 2000.

SCHLÖTTERER, C. The evolution of molecular markers — just a matter of fashion? *Nature Rev. Genet.* 5, 63–69. 2004.

STOLZ, J. F. B. Dinâmica populacional e relações espaciais do tuco-tuco-das-dunas (*Ctenomys flamarioni* – Rodentia – Ctenomyidae) na estação ecológica do Taim – RS/Brasil. 66p. (Dissertação de Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. 2006.

SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution* 15:199-1203. 2000.

TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, KUMAR S. Mega4: molecular evolutionary genetics analysis (mega) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 10.1093/molbev/msm092. 2007.

TARGINO, M. & CARVALHO-E-SILVA, S. P. Redescrição de *Ischnocnema holti* (Cochran, 1948) (Amphibia, Anura, Brachycephalidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 25(4):716–723. 2008.

THOMPSON, J.D., HIGGINS, D. G. AND GIBSON, T.J. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties, and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22, 4673–4680. 1994.

TOMÉ, M. T. C. Diversificação das espécies de *Rhinella* do grupo crucifer (Anura, Bufonidae) na Mata Atlântica. (Dissertação de Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP. 2011.

VENCES M., THOMAS M., BONETT R. M., VIEITES D. R. Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: Chances and challenges. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360:1859–1868. 2005.

