

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

**USANDO O CÓDIGO DE BARRAS (*DNA BARCODING*) PARA  
ACESSAR A DIVERSIDADE DAS ESPÉCIES DE ANUROS DA FEX-  
UFAM**

Bolsista: Jessica Motta de Sousa, CNPq

MANAUS

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL

PIB-B/0055/2010

**USANDO O CÓDIGO DE BARRAS (*DNA BARCODING*) PARA  
ACESSAR A DIVERSIDADE DAS ESPÉCIES DE ANUROS DA FEX-  
UFAM**

Bolsista: Jessica Motta de Sousa, CNPq

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Izeni Pires Farias

MANAUS

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL

PIB-B/0055/2010

---

Bolsista: Jessica Motta de Sousa

---

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Izeni Pires Farias

MANAUS

2011

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 01 Grade da FEX-UFAM.....	9
Figura 02 Visualização em gel de agarose das amostras de DNA.....	11
Figura 03 Árvore filogenética das espécies de anuros.....	11

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 01 Distância genética entre grupos de anuros.....	13
--	----

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	6
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	8
2.1. Coleta das amostras .....	8
2.2. Metodologia do laboratório .....	9
2.3. Análises filogenéticas de <i>barcode</i> .....	10
3. RESULTADOS.....	11
4.DISSCUSSÃO.....	14
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	15
6. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES.....	17

## RESUMO

A floresta Amazônica abriga uma das maiores riqueza de espécies de anfíbios do mundo, mas, estudos sugerem que esta biodiversidade está subestimada. O método do código de barras genético (*DNA barcode*) vem sendo utilizado como técnica padronizada de taxonomia molecular para ajudar a taxonomia e sistemática clássica na identificação e classificação de espécies. Assim, a tecnologia de barcoding foi testada para ser utilizada juntamente com outros dados (morfológicos, etc), no processo de identificação de espécies, verificando a possível existência de espécies crípticas (morfológicamente semelhantes, geneticamente distintas). O gene rRNA16S foi utilizado para acessar a diversidade de anuros da FEX-UFAM. Os principais resultados sugerem que a identificação molecular foi congruente com a identificação baseada em dados morfológicos e observou-se no banco de dados a identificação de um potencial caso de espécie críptica na espécie *Dendrophryniscus minutus*. A metodologia pode ser também uma ferramenta adicional para a identificação de espécies de girinos.

**PALAVRAS-CHAVE:** *DNA Barcode*, Anuros, 16S rRNA

## INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa a primeira posição mundial na relação de países com a maior riqueza de espécies de anfíbios (SBH 2010). Essa mega-diversidade brasileira de anfíbios é fruto principalmente da presença de dois extensos biomas de florestas tropicais, a Amazônia e a Mata Atlântica. Apesar de possuir reconhecidamente uma enorme diversidade a Amazônia continua a ser o bioma brasileiro menos conhecido e amostrado (Lewinsohn & Prado, 2002, 2005). Dentre os grupos de organismos que carregam potencial para aproveitamento econômico e/ou biotecnológico, alguns anfíbios anuros das famílias Hylidae e Dendrobatidae são especialmente visados por possuírem, em sua pele, substâncias químicas bioativas com grande potencial comercial e medicinal (Duellman & Trueb, 1994).

Dentro da anurofauna brasileira ainda existe pouco conhecimento quanto a sua diversidade. Mas, existem vários exemplos de que esta diversidade está subestimada, principalmente pela existência de espécies crípticas (espécies morfológicamente semelhantes mas geneticamente distintas). Alguns casos de trabalhos com grupos de anuros na região Amazônica tem confirmado a presença de espécies crípticas a partir de análises moleculares (e.g. Lötters *et al.*, 2009; Simões *et al.*, 2010), clarificando assim padrões biogeográficos antes ocultados por dificuldades taxonômicas, e claramente demonstrando altos níveis de diversidade biológica.

Dentre as metodologias usadas para as análises moleculares visando a identificação de espécies, a mais recente tem sido o método do código de barras genético (*DNA barcode*). No ano de 2003 Hebert e colaboradores (2003) propuseram o DNA Barcode como técnica padronizada de taxonomia molecular para ajudar a taxonomia e sistemática clássica na identificação e classificação de espécies. DNA Barcode é um sistema desenhado para prover rapidez, acurácia e a identificação automática de espécies usando regiões curtas e padronizadas de genes como marcador interno das espécies (Hebert & Gregory, 2005). O DNA Barcode pressupõe a monofilia recíproca das espécies e que a divergência intra-específica é sempre menor que a divergência interespecífica. De maneira que todos os indivíduos de uma mesma espécie devem agrupar em um único clado diferenciando-se das demais. O DNA Barcode permite a identificação biológica em nível de família, gênero e espécie com grande exatidão na maioria dos casos.

A região escolhida para o *DNA barcode* é um curto segmento de 648 nucleotídeos da extremidade 5' do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade 1 (COI). Este segmento

do gene COI mostrou-se um bom marcador, possuindo uma evolução relativamente rápida e já foi testado em diferentes níveis taxonômicos (filo, ordem e espécie). Além disso, esse gene está presente em todos os animais e apresenta um “sinal” suficiente para diferenciar táxons relacionados na maioria dos casos (Hebert *et al.*, 2003a; Hebert *et al.*, 2003b), ou seja que seria suficiente, na maioria dos metazoários, para identificá-los a nível de espécie. No caso dos anuros, a região estudada é o gene mitocondrial 16s rRNA, que preenche os requisitos para o DNA barcode. (Vences *et al.* 2005) realizou um estudo comprovando a eficácia do gene 16s como marcador mitocondrial com um sucesso de amplificação em 100% para 16S em um subconjunto de amostras, enquanto a combinação de vários primers COI teve menores índices de sucesso. Isso mostra como a região 16S serve para identificação de clados de vertebrados, incluindo anfíbios. Sendo por isso chamado de DNA barcoding dos anfíbios (Vences *et al.* 2005).

O uso dessa metodologia, denominada DNA barcode, ganhou muita relevância com a criação em 2003 do Consortium for the Barcode of Life (CBOL) com sede no Smithsonian Institution, Washington DC, EUA, cuja meta é promover a criação de um banco de dados de sequências parciais de DNA do gene COI, da biodiversidade global, com o objetivo de facilitar o processo de automação da identificação das espécies (ver o sítio [www.barcoding.si.edu](http://www.barcoding.si.edu) para maiores detalhes).

O objetivo principal da técnica barcoding é identificar todas as espécies vivas e não vivas (com material genético disponível) da Terra de maneira a solucionar problemas da taxonomia clássica que podem levar muitas vezes a uma identificação incorreta e a dependência de um especialista; assim como, identificar taxa morfológicamente crípticos. A taxonomia baseada somente, ou principalmente, na seqüência do fragmento de um gene mitocondrial é fortemente criticada principalmente pelos taxonomistas (e.g. Lipscomb *et al.*, 2003; Ebach & Holdrege, 2005; Carvalho *et al.*, 2007), e com razão. Entretanto, os dados do tipo barcode moleculares tem um papel muito importante nos estudos da biodiversidade, e podem ser usados em inventários da biodiversidade, em programas de monitoramento e de fiscalização da fauna (Hajibabaei *et al.*, 2007; Valentini *et al.*, 2009).

Poucas espécies de anuros da Amazônia foram analisadas quanto a sequências moleculares, o que contrasta com a grande riqueza deste bioma e indica o atual grau de subestimação da diversidade amazônica. Neste contexto, a obtenção de *DNA barcodes* a partir de sequências padronizadas de DNA consiste em uma importante ferramenta para a delimitação das espécies e seus limites de distribuição, clarificando a taxonomia vigente, bem

como identificando espécies crípticas. Isso é especialmente importante em se tratando de grupos com morfologia conservativa como várias espécies de anuros.

Nesse contexto o objetivo deste estudo foi caracterizar geneticamente espécies de anuros amazônicos pelo método do código de barras para identificar espécies crípticas na localidade. Se a técnica de identificação por código de barras genético é efetiva, então haverá compatibilidade entre as sequências do código de barras genético e a classificação taxonômica das espécies de anuros.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Coleta das amostras**

A Fazenda Experimental da Universidade Federal do Amazonas (FEX – UFAM) se situa em uma área de floresta primária de terra-firme de 3.000 ha intercalada por áreas de inundação devido a presença de igarapés de grande porte. Na área da Fazenda foi implementada uma grade com 24 km<sup>2</sup> e 41 parcelas de amostragem permanentes (ripárias e terrestres) nos moldes do projeto PPBio (estabelecido em 2007/2008, <http://ppbio.inpa.gov.br/Port/inventarios/ufam>) (Figura 1), utilizando recursos do projeto aprovado (Ed. Universal 470275/2006-0) pelo Prof. Marcelo Menin (ICB/UFAM).

As coletas das amostras no campo foram realizadas em colaboração com a equipe do Prof. Marcelo Menin. Foram realizadas amostragens de girinos e adultos em 15 parcelas ripárias, principalmente nas poças laterais aos igarapés que se formam durante o período chuvoso. Os girinos foram coletados com peneira e puçá, fazendo varredura em toda a extensão da poça, inclusive entre o folhíço e substrato de fundo durante o período diurno. De cada grupo familiar foram coletados 5 girinos para as análises genéticas. Os adultos foram coletados manualmente através de procura visual e auditiva.

Os exemplares coletados foram sacrificados com doses letais de anestésicos apropriados, preservados em formalina 10% e depositados na Coleção Herpetológica do INPA. Os adultos foram identificados através de análise morfológica convencional. Foi formado um banco de sequências das espécies dos indivíduos adultos presentes nos ambientes amostrados. Os girinos foram sequenciados e a obtenção do banco de sequências dos indivíduos adultos encontrados nas regiões amostradas serviu como base de identificação dos girinos, uma vez que a metodologia da taxonomia tradicional nem sempre confirma a identificação de espécies de girinos.

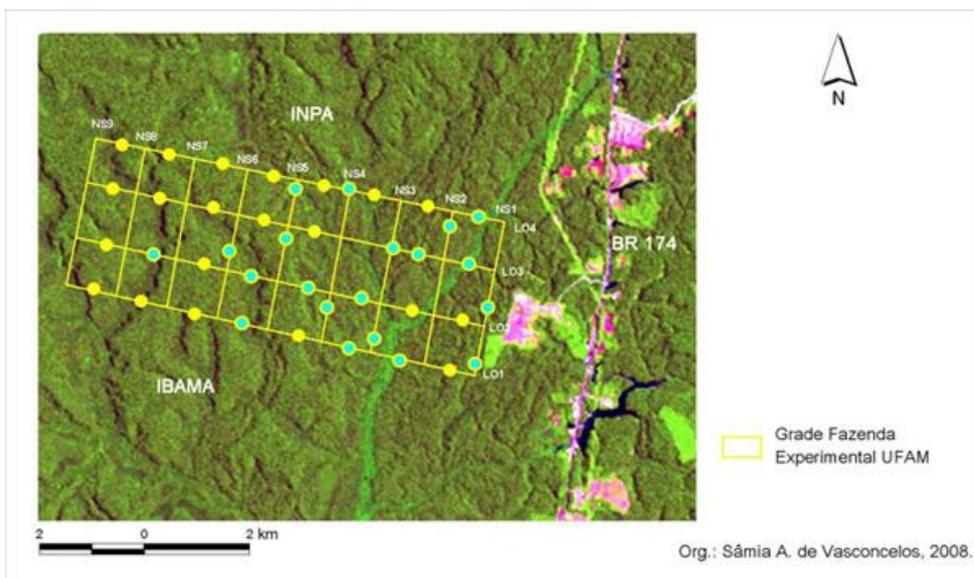


Figura 1. Grade da Fazenda Experimental da UFAM. A grade possui 24 km<sup>2</sup>, sendo 59 km de trilhas e 41 parcelas instaladas (21 parcelas terrestres e 20 parcelas ripárias e aquáticas).

## 2.2 Metodologia no laboratório

O material coletado para o processamento genético foi tecido muscular. Foram utilizadas pequenas amostras de tecidos dos girinos e, no caso de adultos, um dos dígitos. O DNA genômico foi extraído pelo método CTAB (Doyle e Doyle, 1987). Ao término da extração o DNA foi quantificado utilizando marcador de concentração conhecida (Lambda HindIII, Sinapse Biotecnologia, São Paulo). Foi utilizado como marcador molecular o gene 16S mitocondrial (Palumbi, 1996). O gene foi amplificados por PCR (reação em cadeia da polimerase) em um volume final de 15 µl sendo: 1 µl de DNA genômico total; 2 µl de MgCl<sub>2</sub> (25mM); 1.5 µl de DNTP (10mM); 1.5 µl de Buffer 10X (Tris-KCL 200 mM pH 8.5); 2 µl de cada um dos amplificadores (primers) a (2µM); 0.3 µl de Taq DNA Polimerase (1U µl) e 4.4 µl de H<sub>2</sub>O. As condições de PCR seguiram as condições ideais para o marcador já estabelecidas pelo laboratório com os seguintes passos: Desnaturação inicial a 94°C por 1 minuto (uma única vez), 35 ciclos de desnaturação a 93°C por 40 segundos; anelamento na temperatura de 50°C por 40 segundos e extensão a 72°C por 1:30 minutos; após os 35 ciclos extensão final a 72°C por 5 minutos (uma única vez). O produto da PCR foi purificado via

PEG (Polietileno glicol) que elimina da reação amplificada resíduos de baixo peso molecular como sais, primers e dNTPs que interferem nas reações de seqüenciamento. As reações de seqüenciamento foram realizadas em placas para um volume final de 10 µL. Ao término da reação de seqüência, as amostras de DNA resultantes deste foram submetidas ao protocolo ETOH / EDTA de precipitação. O produto precipitado foi resuspenso em 10 µL de formamida. As placas contendo os DNAs foram eletro-injetadas e as seqüências nucleotídicas determinadas pelo seqüenciador automático ABI 3130xl seguindo instruções do fabricante. As seqüências foram editadas no programa BioEdit (Hall, 1999) e alinhadas no programa Clustal W (Thompson et al., 1996).

### **2.3 Análises filogenéticas de barcode**

Um banco de dados das seqüências dos indivíduos adultos das espécies de anuros que ocorrem nas regiões foi montado para que se possa aplicar a metodologia da identificação do barcode nas seqüências dos girinos e assim identificar-se a qual espécie pertencem. Para atender este objetivo utilizamos as ferramentas disponíveis no portal do *DNA Barcoding* (<http://www.boldsystems.org>) – análise padrão de identificação de espécies pela análise genética. Uma vez que o objetivo do *DNA Barcoding* não é a reconstrução filogenética, utilizamos tal ferramenta utilizando o método do Agrupamento de Vizinhos (Neighbour-joining, NJ) (Saitou & Nei, 1987) usando o modelo de distância Kimura-2-parameter (K2P) (Kimura, 1980) para a identificação dos clados e linhagens potencialmente divergentes que possam sugerir novas espécies ou espécies crípticas. A confiabilidade das análises foi estimada pelo método de *bootstrap* com 500 réplicas (Felsenstein, 1985).

## RESULTADOS

Um total de 12 espécies foram identificadas pelo método de taxonomia clássica com a ajuda dos biólogos MSc. Alexandre Cardoso e MSc Edvaldo Mota. Confirmações e dúvidas, principalmente com relação à identificação dos girinos, foram obtidas com a colaboração do Prof. Dr. Marcelo Menin.

Foram sequenciados um total de 60 amostras de anuros da FEX – UFAM. Todas as amostras tiveram os DNAs extraídos, visualizados (Figura 2) e quantificados no equipamento NanoDrop.

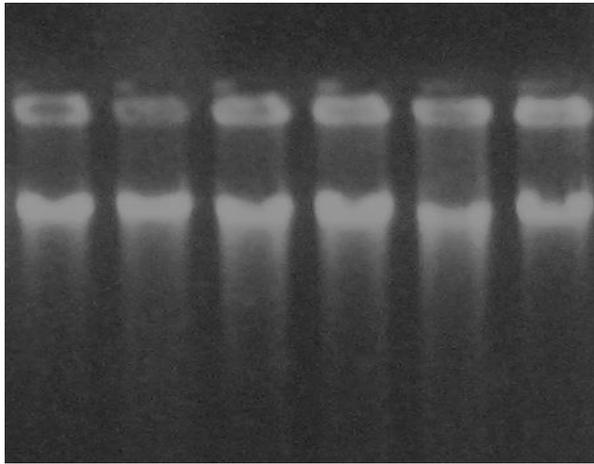


Figura 2. Visualização em gel de agarose das amostras de DNA

O banco de dados do gene rRNA 16S foi composto por um total de 382 pares de bases.

Através da identificação morfológica foram observadas um total de sete gêneros e 12 espécies presentes na região da FEX – UFAM as quais foram corroboradas pelos dados de identificação molecular via barcoding. A lista das espécies segue abaixo:

*Allobates* sp.

*Dendrophryniscus minutus*

*Hypsiboas geographicus*

*Leptodactylus* sp

*Leptodactylus andreae*

*Leptodactylus knudseni*

*Leptodactylus pentadactylus*

*Leptodactylus rhodomystax*

*Osteocephalus oophagus*

*Osteocephalus taurinus*

*Phyllomedusa bicolor*

*Synapturanus* sp.

A análise filogenética das espécies identificadas pode ser visualizada na Figura 3. Através da árvore filogenética utilizando a metodologia do Agrupamento de Vizinhos (Neighbor-Joining) e aplicando-se o modelo de evolução Kimura 2-parâmetros pode-se observar os clados formados por cada espécie.

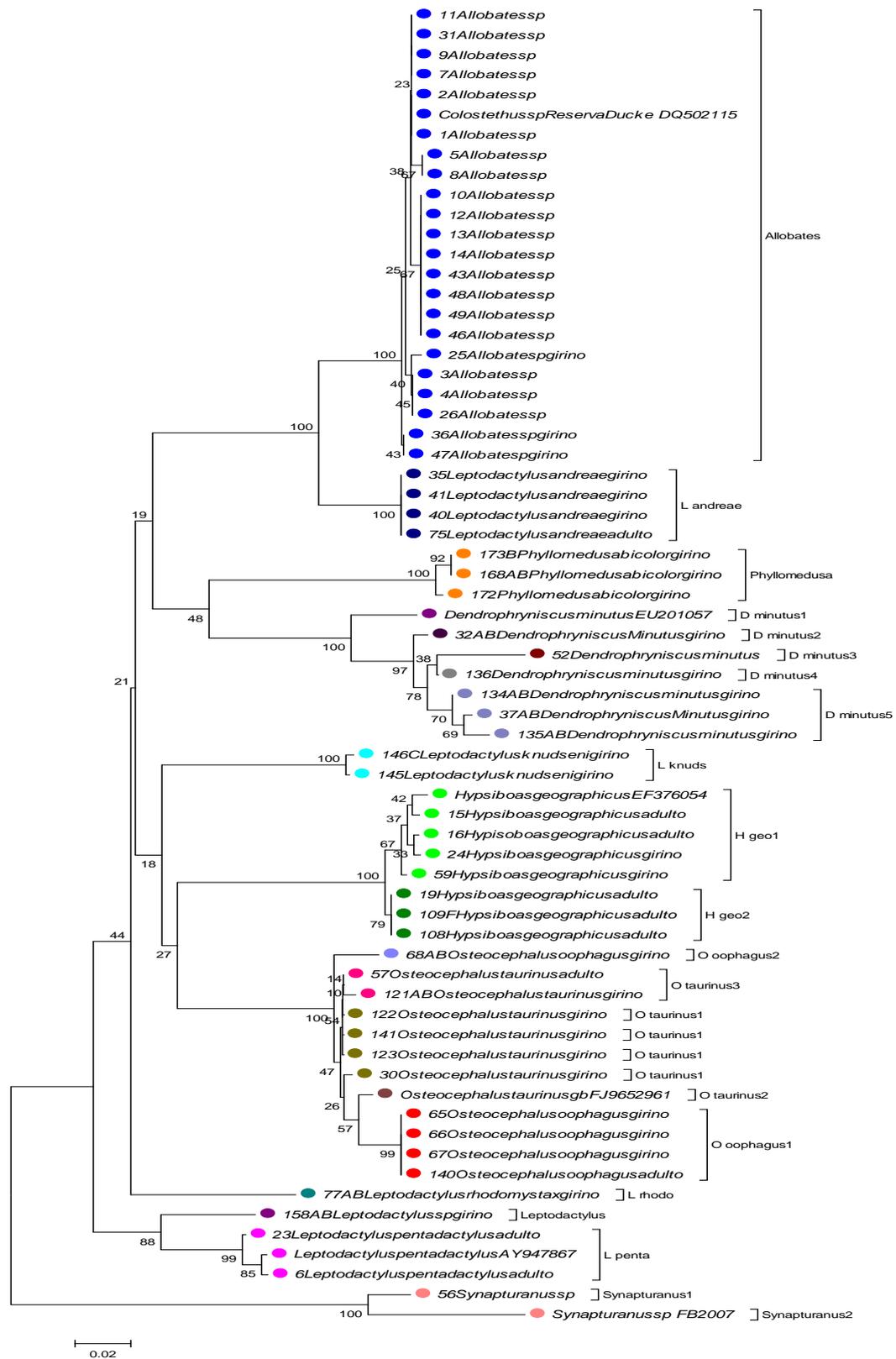


Figura 3: Árvore filogenética das espécies de anuros analisados utilizando-se o seqüenciamento parcial do gene mitocondrial 16S. A reconstrução filogenética seguiu a metodologia de Neighbor-joining e modelo de evolução Kimura 2-parâmetros, como sugerido pelo método do barcoding. Os valores acima e abaixo dos ramos correspondem aos valores de suporte de bootstrap para cada agrupamento. Clados foram nominados para facilitar a visualização dos mesmos na árvore filogenética.

Sequências padrões para a maioria das espécies foram obtidas utilizando-se o recurso do BALST (*Basic Local Alignment Search Tool*) via website do GenBank. Tais indivíduos podem ser visualizados na árvore filogenética com seus respectivos números de acessos.

O modelo de Kimura 2-parâmetros também foi utilizado para a obtenção da matriz de distância genética inter e intra-específica. Com algumas exceções os valores de distância genética entre 0% e 1% foram observados dentro de cada espécie. Valores acima do limite de 2% foram observados entre diferentes espécies de um mesmo gênero ou em potenciais linhagens evolutivas observadas neste presente trabalho. A matriz de distância genética pode ser visualizada na Tabela 1.

Através da análise da árvore filogenética e da matriz de distância genética observou-se dentro da espécie *Dendrophryniscus minutus* linhagens com divergência entre 1% e 4%.

Tabela 1. Matriz de distância utilizando-se o modelo evolutivo Kimura 2-parâmetros. Os valores são listados em porcentagem.

	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12	#13	#14	#15	#16	#17	#18	#19	#20	#21	
#1Allobates																						
#2L_penta	18%																					
#3L_knudseni	18%	12%																				
#4L_andraeae	6%	16%	18%																			
#5L_rhodo	16%	11%	14%	16%																		
#6Leptodactylus	17%	7%	15%	16%	14%																	
#7H_geo1	20%	17%	16%	19%	18%	18%																
#8H_geo2	19%	16%	15%	18%	17%	17%	1%															
#9Phyllomedusa	20%	20%	17%	20%	17%	18%	18%	17%														
#10D_minutus1	19%	24%	19%	17%	19%	21%	19%	18%	16%													
#11D_minutus2	19%	21%	21%	15%	18%	21%	21%	20%	17%	5%												
#12D_minutus3	24%	24%	23%	20%	21%	23%	23%	22%	19%	8%	4%											
#13D_minutus4	20%	21%	20%	16%	18%	19%	21%	20%	16%	5%	1%	3%										
#14D_minutus5	22%	22%	21%	18%	20%	22%	21%	20%	18%	6%	3%	4%	2%									
#15O_taurinus1	17%	14%	14%	20%	13%	17%	15%	13%	16%	19%	20%	23%	19%	21%								
#16O_taurinus2	19%	14%	14%	20%	14%	18%	15%	13%	15%	19%	20%	23%	19%	21%	1%							
#17O_taurinus3	17%	15%	14%	20%	13%	17%	15%	14%	16%	19%	20%	23%	19%	21%	0%	1%						
#18O_oophagus1	20%	15%	15%	22%	14%	19%	16%	14%	17%	19%	20%	23%	19%	21%	3%	2%	3%					
#19O_oophagus2	19%	15%	14%	20%	13%	19%	16%	15%	17%	19%	21%	23%	20%	22%	2%	2%	2%	4%				
#20Synapturanus1	29%	21%	27%	30%	25%	24%	29%	28%	26%	33%	30%	32%	29%	28%	26%	27%	26%	25%	26%			
#21Synapturanus2	32%	27%	33%	34%	30%	29%	35%	33%	32%	36%	34%	37%	33%	32%	30%	31%	30%	29%	31%	7%		

## DISCUSSÃO

O sistema do Código de Barras genético baseado em um curto segmento de DNA mitocondrial 16S rRNA é preciso na identificação das espécies de anuros já descritas (Hebert *et al.*, 2003) por meio de comparações com as sequências disponíveis no GenBank e com a identificação taxonômica. O marcador universal rRNA 16S se mostrou de fácil amplificação e sequenciamento.

A metodologia do código de barras é eficiente em obter uma cobertura geral das espécies, mas está focado no delineamento destas e não no seu relacionamento (Hajibabaei *et al.* 2007). Esta metodologia ocupa uma posição intermediária entre a filogenia molecular e a genética de populações. Enquanto a genética de populações busca por variações dentro e entre populações de uma mesma espécie e a filogenia molecular lida com relações evolutivas entre clados supra-específicos, o DNA *barcode* por sua vez, procura obter uma cobertura completa das espécies.

Como já mencionado na introdução, o objetivo principal da técnica barcoding é identificar todas as espécies vivas e não vivas (com material genético disponível) de maneira a (1) solucionar problemas da taxonomia clássica que podem levar muitas vezes a uma identificação incorreta e a dependência de um especialista; (2) identificar taxa morfológicamente crípticos. No presente trabalho estes dois aspectos foram alcançados. Os girinos são de difícil identificação morfológica e várias amostras de girinos tiveram sua identificação confirmada pelo método do DNA barcoding. A grande maioria dos táxons identificados morfológicamente foi confirmada pela identificação molecular. Desta forma, houve compatibilidade entre as sequências do código de barras genético e a classificação taxonômica das espécies de anuros estudadas no presente trabalho.

Como mencionado anteriormente, a metodologia do DNA Barcode pressupõe a monofilia recíproca das espécies e que a divergência intra-específica (nao mais do que 2%) seja sempre menor que a divergência interespecífica (nao menos do que 2%). De maneira que todos os indivíduos de uma mesma espécie devem agrupar em um único clado diferenciando-se das demais. A metodologia do DNA barcoding nas espécies de anuros da FEX – UFAM também identificou um caso em potencial de espécie críptica dentro da espécie *Dendrophryniscus minutus* uma vez que se observou valores de distância genética acima de 2% entre pares de indivíduos dentro desta espécie. Tais resultados deverão ser confirmados

com um maior número de indivíduos e também através da obtenção de dados morfológicos acurados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Carvalho, M.R.; Bockmann, F.A.; Amorim, D.S.; Brandão, C.R.F.; Vivo, M.d.; Figueiredo, J.L.; Britski, H.A.; de Pinna, M.C.C.; Menezes, N.A.; Marques, F.P.L.; Papavero, N.; Canello, E.M.; Crisci, J.V.; McEachran, J.D.; Schelly, R.C.; Lundberg, J.G.; Gill, A.C.; Britz, R.; Wheeler, Q.D.; Stiassny, M.L.J.; Parenti, L.R.; Page, L.M.; Wheeler, W.C.; Faivovich, J.; Vari, R.P.; Grande, L.; Humphries, C.J.; DeSalle, R.; Ebach, M.C.; Nelson, G.J. 2007. Taxonomic impediment or impediment to taxonomy? A commentary on systematics and the cybertaxonomic-automation paradigm. *Evol. Biol.*, 31: 140-143.
- DUELLMAN, W.E.; TRUEB, L. 1994. *Biology of Amphibians*. The Johns Hopkins University Press. Baltimore, ME, USA. 670 pp.
- EBACH, M.C.; HOLDREGE, C. 2005. More taxonomy, not DNA barcoding. *Bioscience* 55: 822-823.
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.
- HAJIBABAEI, M.; SINGER, G.; CLARE, E.; HEBERT, P. 2007. Design and applicability of DNA arrays and DNA barcodes in biodiversity monitoring. *BMC Biology*, 5: in press.
- HALL, T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.*, 41: 95-98.
- HEBERT, P.D.N.; CYWINSKA, A.; BALL, S.L.; de WAARD, J.R. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Roy. Soc. London B*, 270: 313-321.
- HEBERT, P.D.N.; GREGORY, T.R. 2005. The Promise of DNA Barcoding for Taxonomy. *Syst. Biol.*, 54: 852-859.
- HEBERT, P.D.N.; Ratnasingham, S.; de Waard, J.R. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of Biological Science*, 270: S96-S99.

- KIMURA, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, 16: 111-120.
- LEWINSOHN, T.M.; PRADO, P.I. 2002. *Biodiversidade Brasileira: Síntese do estado atual do conhecimento*. Page 176. Ministério do Meio Ambiente - Conservation International do Brasil, Brasília, DF, Brazil.
- LEWINSOHN, T.M.; PRADO, P.I. 2005. How many species are there in Brazil? *Conserv. Biol.*, 19: 619-624.
- LIPSCOMB, D.; PLATNICK, N.; WHEELER, Q. 2003. The intellectual content of taxonomy: a comment on DNA taxonomy. *Trend Ecol. Evol.*, 18: 65-66.
- LÖTTERS, S.; SCHMITZ, A.; REICHLE, S.; RÖDDER, D.; QUENNET, V. 2009. Another case of cryptic diversity in poison frogs (Dendrobatidae: *Ameerega*) - description of a new species from Bolivia. *Zootaxa*, 2028: 20–30.
- PALUMBI, S. R. (1996). Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. In: *Molecular Systematics*: 205-247. Hillis, D. M., Moritz, C. & Mable, B.K. (Ed.). Sunderland, Massachusetts: Sinauer & Associates Inc.
- SAITOU, N.; NEI, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4: 406-425.
- SIMÕES et al., 2010. The description of a cryptic species related to the pan-Amazonian frog *Allobates femoralis* (Boulenger 1883) (Anura: Aromobatidae). *Zootaxa.*, 2406: 1–28
- THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. 1996. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nuc. Acids Res.*, 22: 4673-4680.
- VALENTINI, A.; POMPANON, F.; TABERLET, P. 2009. DNA barcoding for ecologists. *Trend Ecol. Evol.*, 24: 110-117.
- VENCES, M.; et al., 2005. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Frontiers of zoology.*, 2:5.

