

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 ÉSPECIES DE ANUROS DA
FEX/CAMPUS-UFAM**

Bolsista: Jessica Motta de Sousa, CNPq

MANAUS

2012

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/ 0034/2011

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

Bolsista: Jessica Motta de Sousa, CNPq

Orientadora: Prof^a Dr^a Izeni Pires Farias

Financiamento: CNPq/PPBio

MANAUS

2012

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 Grade da Fazenda Experimental da UFAM.....	9
Figura 02 Parcelas do Campus da UFAM.....	10
Figura 03 Árvore filogenética do grupo <i>Allobates e Anomaloglossus</i>	14
Figura 04 Árvore filogenética do grupo <i>Chiasmocleis e Ctenophryne</i>	15
Figura 05 Árvore filogenética do grupo <i>Amazophrynella</i>	16
Figura 06 Árvore filogenética do grupo <i>Hypsiboas</i>	17
Figura 07 Árvore filogenética do grupo <i>Phyllomedusa</i>	18
Figura 08 Árvore filogenética do grupo <i>Leptodactylus</i>	20
Figura 09 Árvore filogenética do grupo <i>Osteocephalus</i>	21

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 Lista das espécies identificadas pelo <i>DNA Barcode</i>	12
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	6
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	8
2.1. Coleta das amostras.....	8
2.2. Metodologia do laboratório.....	10
2.3. Análises filogenéticas de <i>barcode</i>	11
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	12
4. CONCLUSÃO.....	22
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23
6. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES.....	25

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) 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- Campus/ UFAM. Os principais resultados sugerem que a identificação molecular foi congruente com a identificação baseada em dados morfológicos, porém espécies do gênero *Leptodactylus*, *Amazophrynella*, *Hypsiboas*, *Osteocephalus* e *Chiasmocleis* apresentaram divergência genética acima de 3% com espécies padrões do Genbank provenientes da Guiana, Equador e Peru, sugerindo possíveis complexos de espécies. As espécies *Amazophrynella minuta*, *Leptodactylus pentadactylus* e *Hypsiboas cinerascens* foram analisadas entre as localidades apresentando divergência genética entre 0,4 e 1% sugerindo estruturação genética. Esses resultados sugerem que a biodiversidade da anurofauna da Amazônia central está subestimada, e a análise de DNA barcode é eficiente em mostrar possíveis novas espécies.

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

1. 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 morfologicamente 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 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 morfologicamente 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 nas localidades e estabelecendo comparações entre espécies encontradas em ambos sítios de coleta. 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.

2.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 km² 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).

O campus da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) cobre uma área de aproximadamente 600 hectares, contendo áreas de platôs e baixios, com floresta primária, floresta secundária, áreas de campinaranas e áreas desmatadas com plantações. O campus está localizado na região leste da cidade de Manaus e está isolado por bairros e avenidas ao seu redor. Este sítio conta com 10 parcelas ripárias e 10 parcelas aquáticas. Essas parcelas estão nos moldes do projeto PPBio (estabelecido em 2007/2008, <http://ppbio.inpa.gov.br/Port/inventarios/campusufam>) (Figura 2), utilizando recursos do projeto aprovado (Ed. Universal 470375/2006-0) pelo Prof. Marcelo Menin (ICB/UFAM).

As coletas das amostras no campo foram realizadas em colaboração com a equipe do Prof. Marcelo Menin. As amostragens de girinos e adultos foram realizadas em 10 parcelas ripárias (Campus) e 15 parcelas ripárias (FEX), 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 folhiço 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 mortos com doses de anestésicos apropriados, preservados em álcool 95% e depositados na Coleção de Tecidos de Genética Animal – CTGA-ICB/UFAM. 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 pela obtenção do banco de sequências dos indivíduos adultos encontrados nas regiões amostradas identificamos quais são as espécies dos girinos.

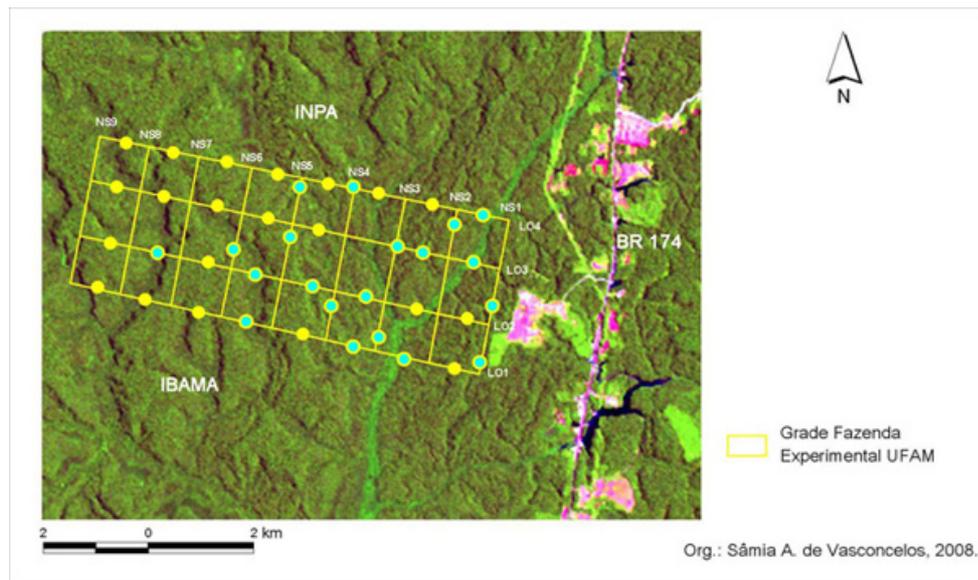


Figura 1. Grade da Fazenda Experimental da UFAM. A grade possui 24 km², sendo 59 km de trilhas e 41 parcelas instaladas (21 parcelas terrestres e 20 parcelas ripárias e aquáticas).

FONTE: Retirado de < <http://ppbio.inpa.gov.br/sitios/fazufam/> > Acesso em: 19/06/12

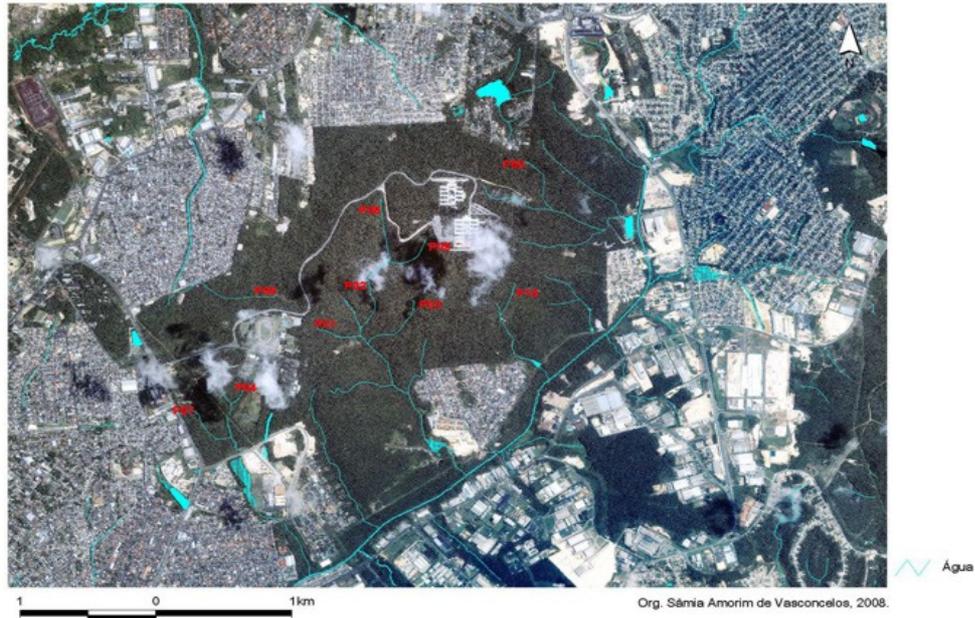


Figura 2. Parcelas do Campus da UFAM. Este sítio conta com 10 parcelas ripárias e 10 parcelas aquáticas.

FONTE: Retirado de < <http://ppbio.inpa.gov.br/Port/inventarios/campusufam/>> Acesso em: 25/01/12

2.2 Metodologia no laboratório

Extração de DNA, Amplificações Gênicas e Seqüenciamento

O material coletado para o processamento genético foi o tecido muscular. São utilizadas pequenas amostras de tecidos dos girinos e, no caso de adultos, um dos dígitos. Após a retirada dos tecidos os animais são preservados em álcool 95%.

O DNA genômico foi extraído pelo método Fenol/ Clorofórmio (Ritchie *et al* ,1997). 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). Tal gene foi amplificado por PCR (reação em cadeia da polimerase) em um volume final de 15 μ l sendo: 1 μ l de DNA genômico total; 2 μ l de MgCl₂ (25mM); 1.5 μ l de DNTP (10mM); 1.5 μ l de Buffer 10X (Tris-KCL 200 mM pH 8.5); 2 μ l de cada um dos amplificadores (primers) a (2 μ M); 0.3 μ l de Taq DNA Polimerase (1U μ l) e 4.4 μ l de H₂O. As condições de PCR seguiram as condições ideais para o marcador e já estão estabelecidas pelo nosso grupo 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 ExoSap que elimina da reação amplificada resíduos de baixo peso molecular como sais, primers e dNTPs que interferem nas reações de sequenciamento.

As reações de sequenciamento foram feitas em placas para um volume final de 10 µL contendo 2,0 µL de DNA amplificado e purificado, 2,0 µL de um dos primers, 0,3 µL de Big Dye e 2,5 µL de água autoclavada deionizada, 1,5 µL do tampão de reação do Big Dye para cada amostra. Em seguida as amostras foram submetidas ao termociclador por 35 ciclos de 96°C durante 10 segundos, 50°C durante 15 segundos e 60°C durante 4 minutos. Ao término da reação, as amostras de DNA resultantes deste PCR foram submetidas ao protocolo EtOH / EDTA de precipitação. O produto precipitado foi resuspendido em 10 µL de formamida. As placas contendo os DNAs foram eletro-injetadas e as sequências nucleotídicas foram determinadas pelo sequenciador automático ABI 3130xl seguindo instruções do fabricante. As sequências obtidas foram editadas no programa Bioedit (Hall, 1999), alinhadas com o auxílio da ferramenta Clustal W (Thompson *et al.*, 1996) sendo a base para a construção de uma matriz de dados contendo todas as sequências nucleotídicas.

2.3 Análises filogenéticas de barcode

Um banco de dados das sequências 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 sequências 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, utilizaremos 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 1000 réplicas (Felsenstein, 1985). Para complementar os resultados encontrados utilizamos medidas de

divergência intra-interespecífica baseado em distâncias genéticas K2-P para as comparações dos grupos encontrados em ambas localidades.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidas no total 237 amostras nas coletas na FEX-UFAM e 59 amostras nas coletas no Campus. Somente algumas amostras foram selecionadas (pelo menos 5 indivíduos para cada espécie) formando um banco de dados de 180 sequências.

Encontramos 25 morfotipos que tiveram a sua identificação confirmada pelo *DNA Barcode* (Tabela 1).

Tabela 1. Lista das 25 espécies identificadas pelo *DNA Barcode*.

Espécie	Estágio de vida	Localidade
<i>Allobates</i> sp.	Girino	FEX/CAMPUS-UFAM/
<i>Allobates femoralis</i>	Girino	FEX-UFAM
<i>Anomaloglossus stephensi</i>	Girino	FEX-UFAM
<i>Chiasmocleis hudsoni</i>	Girino	FEX-UFAM
<i>Ctenophryne geayi</i>	Girino	FEX-UFAM
<i>Amazophrynella minuta</i>	Adulto/Girino	FEX/CAMPUS-UFAM
<i>Dendropsophus cf. brevifrons</i>	Adulto/Girino	FEX-UFAM
<i>Hypsiboas cinerascens</i>	Adulto/Girino	FEX/CAMPUS-UFAM
<i>Hypsiboas geographicus</i>	Adulto/Girino	FEX-UFAM
<i>Hypsiboas lanciformis</i>	Adulto	CAMPUS-UFAM
<i>Leptodactylus andreae</i>	Adulto	FEX/CAMPUS-UFAM
<i>Leptodactylus hylaedactyla</i>	Adulto	CAMPUS-UFAM
<i>Leptodactylus knudseni</i>	Girino	FEX-UFAM
<i>Leptodactylus mystaceus</i>	Girino	FEX-UFAM
<i>Leptodactylus pentadactylus</i>	Adulto	FEX/CAMPUS-UFAM
<i>Leptodactylus petersii</i>	Girino/Adulto	CAMPUS-UFAM
<i>Leptodactylus rhodomystax</i>	Girino	FEX-UFAM
<i>Leptodactylus riveroi</i>	Adulto	FEX-UFAM
<i>Osteocephalus oophagus</i>	Adulto/Girino	FEX-UFAM
<i>Osteocephalus taurinus</i>	Adulto/Girino	FEX-UFAM
<i>Phyllomedusa bicolor</i>	Girino	FEX-UFAM
<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	Girino	FEX-UFAM
<i>Pipa pipa</i>	Adulto	FEX-UFAM
<i>Pristimantis fenestratus</i>	Adulto	CAMPUS-UFAM
<i>Rhinella proboscidea</i>	Adulto	FEX-UFAM
<i>Synapturanus</i> sp.	Adulto	FEX-UFAM

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

Não foi possível obter um número máximo de indivíduos de cada espécie para as análises comparativas entre FEX e UFAM, sendo assim mostraremos os resultados com somente com as espécies que foram possível fazer tal comparação. Os resultados das análises para cada espécie são mostrados a seguir.

- Grupo *Allobates* e *Anomaloglossus*

Foram identificados um total de 35 indivíduos pertencentes ao gênero *Allobates* e 2 indivíduos pertencentes ao gênero *Anomaloglossus*. Os dois indivíduos de *Anomaloglossus* foram identificados morfologicamente como sendo *Allobates*, mas as sequências obtidas foram identificadas geneticamente com *Anomaloglossus*. Os valores de distância genética intraespecífica na espécie *Allobates* sp foi de 1% (Kimura 2 parâmetros). Os valores obtidos de distância interespecífica foram de 5% a 16%. A árvore obtida para este grupo pode ser visualizada na figura 3. Os indivíduos identificados para este grupo pertencem a uma espécie que ainda está sendo descrita com os tipos provenientes da Reserva Ducke.

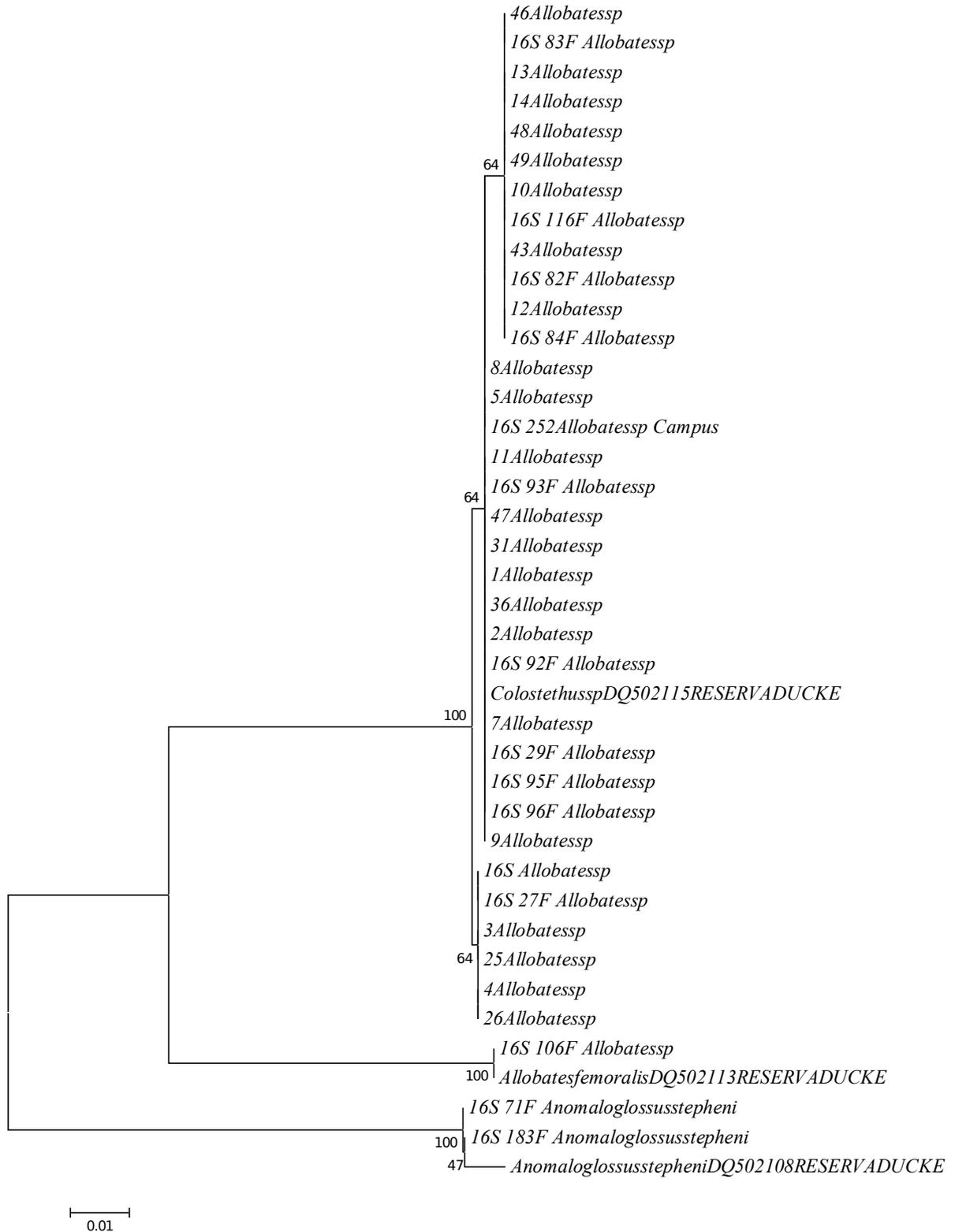


Figura 3: Árvore filogenética do grupo *Allobates* e *Anomaloglossus*. A reconstrução filogenética seguiu a metodologia de Neighbor-joining e modelo de evolução Kimura 2-parâmetros.

- Grupos *Chiasmocleis* e *Cternophryne*

Todos os 15 indivíduos pertencentes a este grupo foram identificados morfologicamente como sendo do gênero *Chiasmocleis*, entretanto a identificação molecular evidenciou a presença de dois gêneros *Chiasmocleis* e *Ctenophryne*, pertencentes as espécies *Chiasmocleis hudsoni* e *Ctenophryne geayi*. A árvore obtida para este grupo por ser visualizada na Figura 4. Os valores de distância genética interespecífica foram em média de 19%. A espécie identificada como *Chiasmocleis hudsoni* apresentou divergência genética de 3% com a sequência padrão do Genbank proveniente da Guiana, enquanto a espécie *Ctenophryne geayi* apresentou divergência genética de 1% com a sequência equivalente a sequência do GenBank provenientes da Guiana. Vale ressaltar que os girinos destas duas espécies são muito semelhantes e de difícil identificação em campo. Este é mais um caso onde a identificação molecular entra como uma excelente ferramenta.

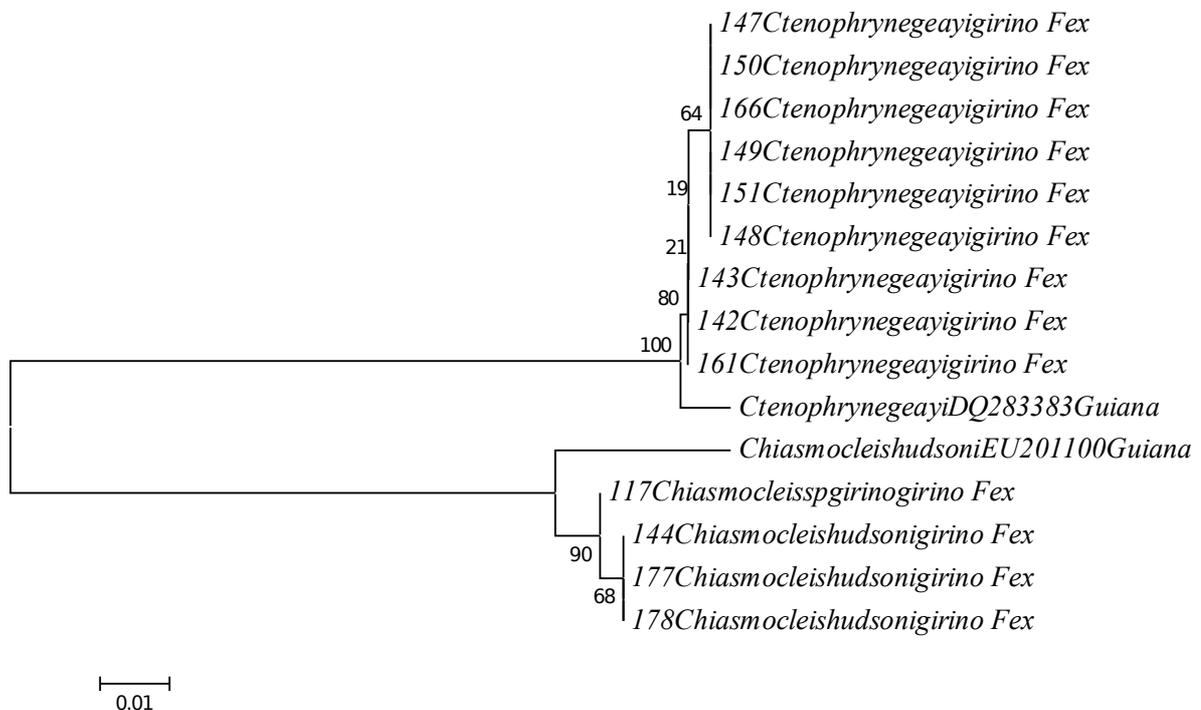


Figura 4: Árvore filogenética do grupo *Chiasmocleis/Ctenophryne*.

- Grupo *Amazophrynella*

Foram identificados 24 indivíduos para a espécie *Amazophrynella minuta*. A árvore obtida para este grupo por ser visualizada na Figura 5. Os indivíduos identificados no presente trabalho apresentaram valores de distância intraespecífica com relação as localidades da Guiana e Equador que variaram entre 6 a 16%. Tal resultado evidencia que os indivíduos

coletados na FEX e no Campus podem potencialmente ser uma espécie diferente das descritas. Entretanto, para confirmar tal achado deve-se realizar um trabalho envolvendo um maior número de indivíduos e de outras regiões geográficas.

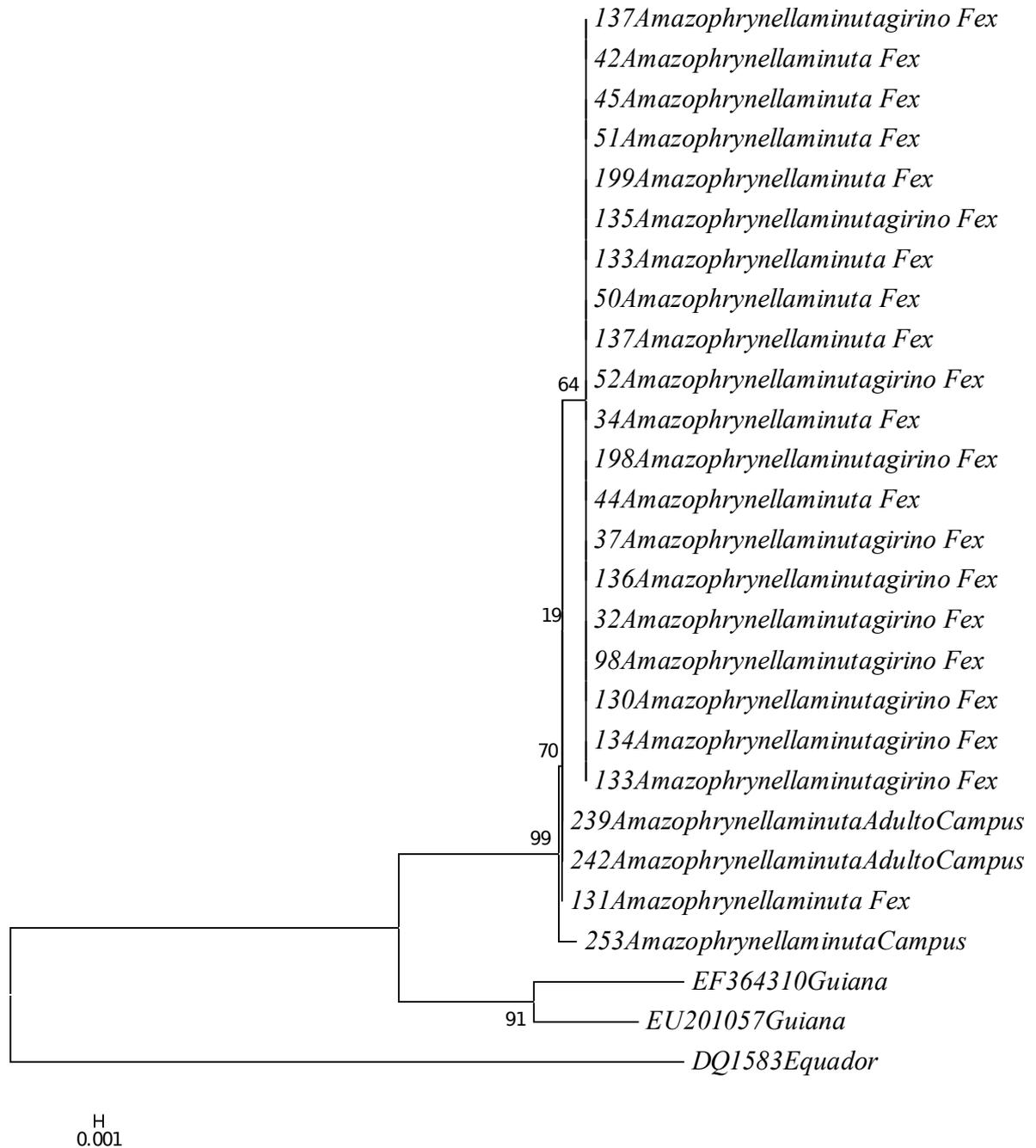


Figura 5: Árvore filogenética do grupo *Amazophrynella*.

- Grupo *Hypsiboas*

Foram identificados 25 indivíduos pertencentes a 3 espécies de *Hypsiboas* (*H. cinerascens* e *H. geographicus* e *H. lanciformis*). A árvore obtida para este grupo por ser visualizada na Figura 6. A média de distância genética interespecífica variou de 14% (entre *H. cinerascens* e *H. geographicus*) a 20% (entre *H. geographicus* e *H. cinerascens* (anteriormente descrita como *Hyla granosa*). A média de distância genética intraespecífica variou de 1% a 2%, com exceção dos valores obtidos entre os exemplares de *H. cinerascens* provenientes da Guiana comparados com indivíduos do presente trabalho, os quais mostraram valores entre 11 e 12%.

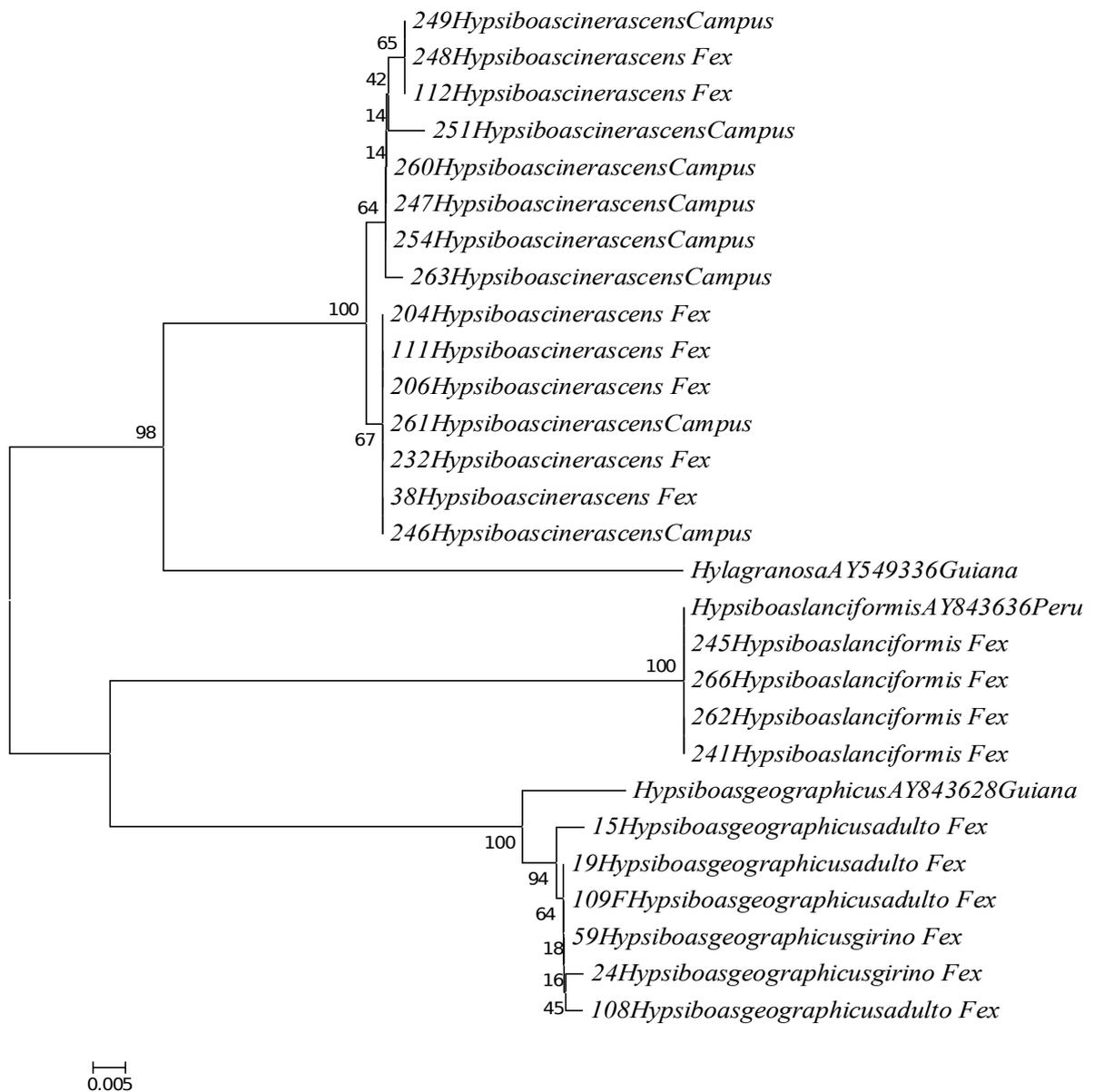


Figura 6: Árvore filogenética do grupo *Hypsiboas*.

- Grupo *Phyllomedusa*

Foram identificados 10 indivíduos pertencentes a 2 espécies de *Phyllomedusa* (*P. bicolor* e *P. Tomopterna*). A distância genética interespecífica variou de 10 a 12% e intraespecífica de 1% a 4%, com valores maiores quando as comparações envolveram a espécie *P. tomopterna* coletada no presente trabalho comparada com a sequência referência do GenBank proveniente da Peru. A árvore de NJ obtida para este grupo por ser visualizada na Figura 7.

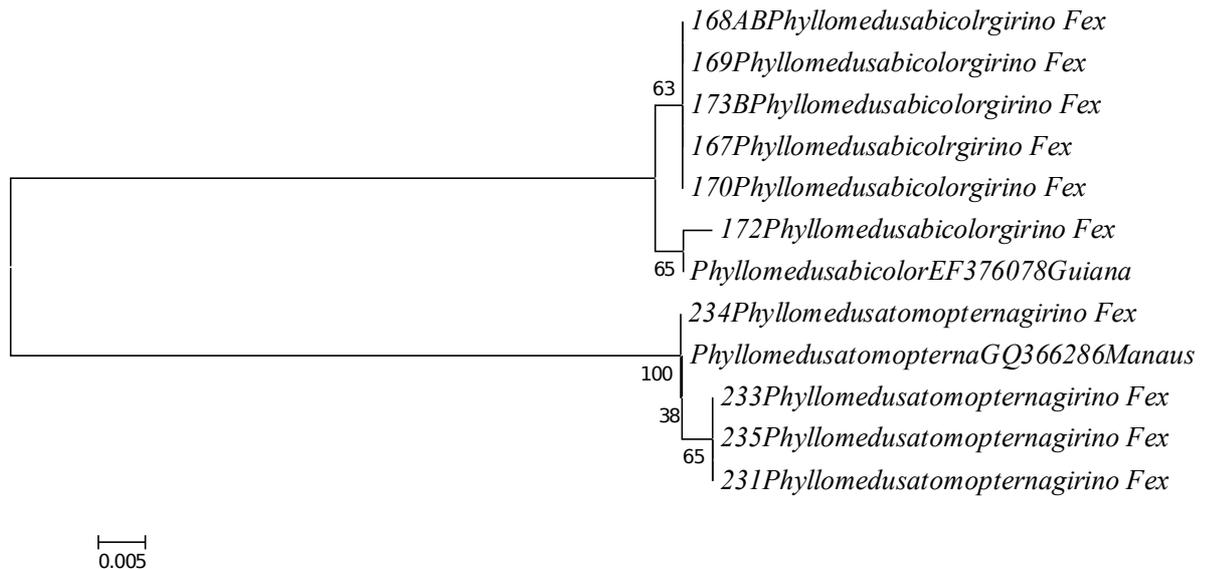


Figura 7: Árvore filogenética do grupo *Phyllomedusa*.

- Grupo *Leptodactylus*

Foram identificados 46 indivíduos pertencentes a 9 espécies de *Leptodactylus* (*L. mystaceus*, *L. rhodomystax*, *L. knudseni*, *L. pentadactylus*, *L. riveroi*, *L. hylaedactyla*, *L. petersii*, *L. andreae* e *L. sp.*). A árvore de NJ obtida para este grupo por ser visualizada na Figura 8. Os valores de distância interespecífica variaram de 8% a 27%. Um caso de provável nova espécie pode ser sugerido para *L. andreae*, quando comparamos os valores de distância genética entre as localidades do presente trabalho, rio Madeira e os indivíduos obtidos do GenBank provenientes da Equador, valores esses que variaram de 4% a 9%. Entretanto, deverão ser coletados mais indivíduos e em uma ampla distribuição geográfica. Esta questão já está sendo analisada pelo nosso grupo de pesquisa. A espécie identificada como *L. hylaedactyla* apresentou uma divergência genética de 1% em relação a sequência do Genbank proveniente da Guiana (EU201053). Porém apresentou divergência genética entre 4% a 5%

com a sequência proveniente da Bolívia (JF789892), evidenciando mais um caso de complexos de espécies.

Dentro da nossa amostragem obtivemos três indivíduos de *Leptodactylus* coletados no Campus que foram identificados morfológicamente como sendo provavelmente de *L. riveroi* e *L. petersii* (21, 35 e 41), entretanto as análises genéticas evidenciaram uma distância genética com outros indivíduos de *L. petersii* que variaram de 6% com os indivíduos do Campus, 5% com o indivíduo da Guiana e 6% com o indivíduo da Bolívia, evidenciando um provável caso de espécie críptica. Tal grupo deverá ser melhor estudado em sua distribuição para um melhor entendimento de seus padrões filogeográficos e filogenéticos.

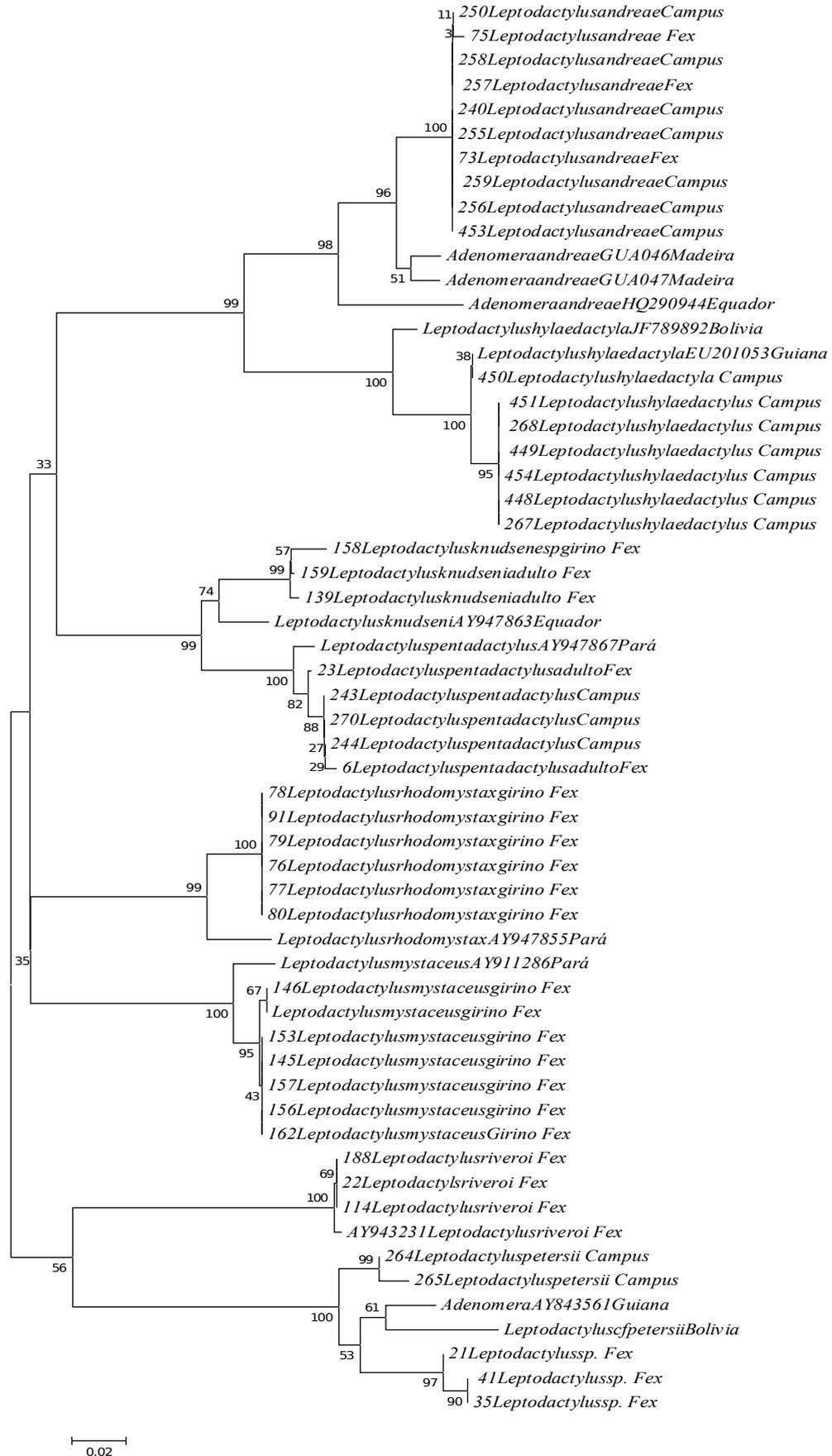


Figura 8: Árvore filogenética do grupo *Leptodactylus*.

- Grupo *Osteocephalus*

Foram identificados 16 indivíduos pertencentes a 2 espécies de *Osteocephalus* (*O. taurinus* e *O. oophagus*). A árvore de NJ obtida para este grupo por ser visualizada na Figura 8. A variação interespecífica foi em média de 3%. A identificação morfológica e molecular obtida para as duas espécies no presente trabalho não foi confirmado com os indivíduos referência obtidos no GenBank. Portanto, tais resultados devem ser vistos com cautela necessitando uma melhor amostragem e a obtenção de sequencias de indivíduos adultos, uma vez que todas as amostras analisadas foram obtidas de girinos, o que pode levar a um erro de identificação, uma vez que as duas espécies são bastante semelhantes em suas formas larvais.

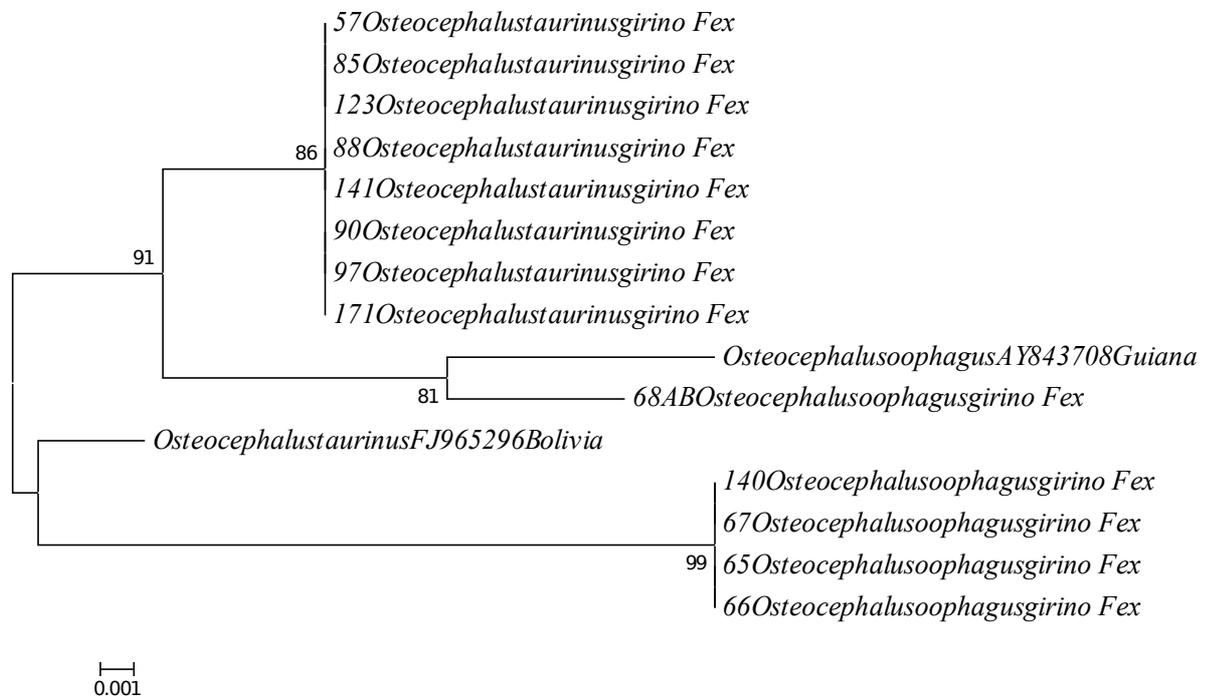


Figura 9: Árvore filogenética do grupo *Osteocephalus*.

Outras espécies foram identificadas molecularmente via barcode, mas como foram poucos indivíduos não foram incluídos em grupos, são elas: *Dendropsophus* cf. *brevifrons*, *Rhinella proboscidea*, *Pipa pipa* e *Pristimantis fenestratus*.

As espécies que foram encontradas em ambas localidades para uma análise comparativa de divergência intraespecífica foram: *Amazophrynella minuta*, *Hypsiboas cinerascens* e *Leptodactylus pentadactylus*. Essas espécies mostraram divergência entre 0,4 a 1% indicando estruturação populacional. A espécie *Leptodactylus andreae* também foi analisada apresentando 0% de divergência entre as localidades.

4. CONCLUSÃO

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.

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.

A metodologia do DNA barcoding nas espécies de anuros da FEX/Campus – UFAM também identificou casos em potencial de espécies crípticas dentro das espécies *Amazophrynella minuta*, *Leptodactylus andreae*, *Leptodactylus hylaedactylus*, *Chiasmocleis hudsoni*, *Hypsiboas cinerascens* e *Osteocephalus taurinus*, uma vez que se observou valores de distância genética acima de 3% entre pares de indivíduos dentro destas espécies quando comparados com sequências referência do GenBank provenientes da Guiana, Equador e Bolívia. Estes resultados sugerem que a biodiversidade da anurofauna amazônica está sendo subestimada, e as análises de *DNA barcoding* é suscetível a descobrir novas espécies para esta região da Amazônia Central.

5. 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.
- FOUQUET, A; *et al.*. 2007. Underestimation of Species Richness in Neotropical Frogs Revealed by mtDNA Analyses. *PLoS ONE.*, 10 / e1109
- 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.; REICHLER, 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.
- 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.

6. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Descrição	Ago 2011	Set	Out	Nov	Dez	Jan 2012	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
Coletas no campo	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
Extrações de DNA	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
Amplificações gênicas via PCR		X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Análises de acordo com a metodologia do DNA barcoding				X	X	X	X	X	X	X	X	
Análises filogenéticas							X	X	X	X	X	
Elaboração do Resumo e Relatório Final											X	
Preparação da Apresentação Final para o Congresso												X