

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Programa de Pós-graduação em Genética, Conservação e Biologia
Evolutiva

Estudo da variabilidade genética de *Phyllomedusa bicolor* (Anura; Hylidae) na Amazônia brasileira

EDVALDO PEREIRA MOTA

MANAUS – AM
DEZEMBRO DE 2010

EDVALDO PEREIRA MOTA

Estudo da variabilidade genética de *Phyllomedusa bicolor* (Anura; Hylidae) na Amazônia brasileira

ORIENTADORA: IZENI PIRES FARIAS, Dra.

CO-ORIENTADORA: ALBERTINA PIMENTEL LIMA, Dra.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

Fonte Financiadora:

CNPq/CT-AMZ Nº processo 553997/2006-8

Apoio: Laboratório de Evolução e Genética Animal – LEGAL

**MANAUS – AM
DEZEMBRO DE 2010**

FICHA CATALOGRÁFICA

M917 Mota, Edvaldo Pereira
Estudo da variabilidade genética de *Phyllomedusa bicolor*
(Anura: Hylidae) na Amazônia brasileira / Edvaldo Pereira
Mota -- Manaus : [s.n.], 2010
x, 52 f. : il. (algumas color.)

Dissertação (mestrado em Genética, Conservação e Biologia
Evolutiva)--INPA, Manaus, 2010.
Orientadora: Dra. Izeni Pires Farias
Co-orientadora: Dra. Albertina Pimentel Lima

1.*Phyllomedusa bicolor* - Diversidade genética 2.DNA
mitocondrial 3.Kambô I.Título

CDD 19ª ed. 597.80415

Sinopse:

Estimaram-se os níveis de variabilidade genética da espécie *Phyllomedusa bicolor* na Amazônia brasileira. Os dados gerados por meio de marcadores moleculares do tipo DNA Mitocondrial foram usados para acessar a diversidade genética na espécie. Sugere-se que as populações de *P. bicolor* apresentam um padrão de diferenciação mediado por um isolamento por distancia tendo em vista as grandes distâncias geográficas encontradas entre as localidades.

Palavras-chave: DNA Mitocondrial, Kambô, diversidade genética, estrutura genética

Dedico este trabalho a minha família: minha esposa Simony Malagueta, meu filho Miguel Mota, mãe Maria Miranda, meu pai Suelivaldo Mota, meu irmão Elton Mota e minha irmã Eloisa Mota, pela paciência, incentivo e, principalmente, o amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Dra. Izeni Pires Farias por toda a orientação, apoio, amizade e por tudo que me acrescentou na vida desde a graduação até os dias de hoje.

À Dra. Albertina Pimentel Lima pelos sábios conselhos e orientações, pela paciência e por todos os ensinamentos imprescindíveis para realização das coletas desse trabalho.

Ao Dr. Tomas Hrbek pelas explicações e auxílios nas análises, sem dúvida seus ensinamentos foram fundamentais nessa reta final.

Aos colegas do Laboratório de Evolução e Genética Animal (LEGAL) pela ajuda e pela amizade: Mário Nunes, Manuela Amado, Waleska Gravena, Aureo Banhos, Daniel Toffoli, Pedro Ivo, Deyla Paula, Daniela Leroy, Maria da Conceição, Adriano Cantuária e todos aqueles que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

A toda equipe que deu o suporte para as coletas no Acre (Cruzeiro do Sul e Rio Branco), principalmente as pessoas de: Paulo Bernades, Reginaldo Machado.

Aos meus amigos da faculdade que viraram amigos para vida toda: Alexandre Almeida, Mário Nunes, Caio Fábio, Veber Moura, Bruno Minoru, Carlos Eduardo, Guilherme Cal, Aída, Taynah, Luana, e todos os amigos de verdade que fiz nesse início da vida acadêmica

Agradeço de forma especial a minha esposa, meu amor Simony Malagueta pelo carinho, compreensão, paciência, incentivo, tempo e amor. Sem a sua ajuda jamais seria quem sou agora, jamais teria a vida maravilhosa que tenho com você. Obrigado por ter dado mais alegria a minha vida com a chegada do nosso filho “Miguelito”.

À minha família, meu pai Suelivaldo (seu Mota), minha mãe Maria (guerreira), meu irmão Elton e minha irmã Eloisa por todo apoio.

Ao Curso de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e à Universidade Federal do Amazonas, pelo auxílio e infra-estrutura para a realização deste trabalho

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo auxílio financeiro para o projeto e pela bolsa.

À todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A espécie *Phyllomedusa bicolor* possui potencial biotecnológico, pois sua secreção epidérmica é rica em substância bioativas. Esta espécie, conhecida popularmente como kambô pelos índios do grupo linguístico *pano*, é usada em rituais de cura e na preparação para a caça. É uma espécie de ampla distribuição na Amazônia que carece de estudos que visem a sua história evolutiva bem como estrutura populacional. Neste estudo empregamos o uso do DNAmT como ferramenta molecular para estudar 117 indivíduos de *P. bicolor* de onze diferentes localidades em 5 estados na Amazônia brasileira. O banco de dados para as análises populacionais foi composto de 117 sequências nucleotídicas, cada uma com um total de 1037 pares de bases (pb) que resultaram em um banco de dados concatenados para o DNAmT (sendo um fragmento de 16S de 520 pb e um fragmento da Região Controle de 517 pb). As sequências foram alinhadas e editadas no programa BIOEDIT. A partir destas, foi gerada uma matriz de dados que foi usada nas análises estatísticas populacionais implementadas no programa ARLEQUIN. As análises de SAMOVA e BAPS foram usadas para determinar os agrupamentos de populações *a posteriori*. A rede de haplótipos, os dados gerados pelo programa GEODIS e a interpretação da chave de Templeton foram gerados com o uso do programa ANECA. Verificou-se a existência de 31 haplótipos para o DNAmT, sendo que 21 são únicos dentro da amostragem. A diversidade gênica (h) total foi estimada em 0,884, sendo que este valor é elevado quando comparado aos valores das localidades amostradas. O teste de AMOVA revelou que há uma forte estruturação genética, a qual é apoiada significativamente pelo índice de fixação ($\Phi_{ST} = 0.8166$; $P < 0,001$), onde a maior parte de toda a variação genética (81,66%) está distribuída entre as populações. As comparações par a par do fluxo gênico mostram que as populações da R.F. Adolpho Ducke, UFAM e Rebio Uatumã apresentaram altos valores no número efetivo de fêmeas migrantes por geração (N_{mf}), o que indica que existe fluxo gênico. As análises de NCPA definiram seis níveis hierárquicos correspondentes aos cladogramas, 1-7, 2-2, 2-7, 3-1, 3-2 e 4-1, nos quais há a rejeição da hipótese nula da não associação entre distância geográfica e divergência genética, na maioria das vezes indicando fluxo gênico restrito. O valor de K com maior significância (K=4) explica a formação dos grupos com a seguinte configuração: grupo 1) UFAM, Reserva Florestal Adolfo Ducke e Rebio Uatumã; grupo 2) Barcelos, PARNA do Viruá e FLONA do Amapá; grupo 3) Altamira; grupo 4) Cruzeiro do Sul, Santa Isabel do Rio Negro, Tabatinga e Atalaia do Norte. Na análise bayesiana de estrutura de população verificamos que o melhor valor da probabilidade posterior para a formação de grupos corresponde a um número igual a cinco. Quatro localidades apresentaram altos níveis de variabilidade genética para o DNAmT: R.F. Adolpho Ducke, Rebio Uatumã, UFAM e Acre. Os segmentos do gene 16S e da Região Controle (parte central) mostraram-se ligeiramente conservados, o que influenciou na quantidade reduzida de sítios polimórficos e números de haplótipos encontrados nas populações de *P. bicolor*. Por meio das distâncias genéticas, verificamos que há uma maior diferenciação entre pares de localidades da Amazônia Central, Escudo das Guianas e Escudo Brasileiro em relação às localidades do Oeste Amazônico. Portanto, nossos resultados indicam que possivelmente as populações de *P. bicolor* apresentam um padrão de diferenciação mediado por isolamento por distância tendo em vista as grandes distâncias geográficas encontradas entre as localidades. Entretanto, coletas adicionais deverão

ser realizadas para fornecer informações mais precisas sobre este padrão de diferenciação.

ABSTRACT

The species *Phyllomedusa bicolor* has biotechnological potential, since its secretion is rich in epidermal bioactive substance. This species, popularly known as the Indians Kambô cloth linguistic group, is used in healing rituals in preparation for hunting. It is a widely distributed species in the Amazon that lacks studies that focus on their evolutionary history and population structure. This study employed the use of mtDNA as a molecular tool to study 117 individuals of *P. bicolor* from eleven different locations in five states in the Brazilian Amazon. The database for the analysis population was composed of 117 nucleotide sequences, each with a total of 1037 base pairs (bp) which resulted in a database for the concatenated mtDNA (a fragment of 520 bp of 16S and a Control Region fragment of 517 bp). The sequences were aligned and edited in the BioEdit program. From these, we generated a data matrix that was used in the analysis population statistics implemented in the program ARLEQUIN. Analyses of Samovar and BAPS were used to determine the groupings of the populations later. Haplotype network, the data generated by the program GEODIS and interpretation of key Templeton were generated using the program ANECA. Verified the existence of 31 haplotypes for the mtDNA, and 21 are unique within the sample. The gene diversity (h) total was estimated at 0.884, and this value is high compared to the values of sites. The AMOVA test revealed that there is a strong genetic structure, which is significantly supported by the fixation index ($\Phi_{ST} = 0.8166$, $P < 0.001$), where the bulk of all genetic variation (81.66%) is distributed among the populations. Pairwise comparisons of gene flow show that populations of RF Adolpho Ducke, UFAM Rebio Uatumã and showed high values in the effective number of female migrants per generation (N_{emf}), which indicates that there is gene flow. The NCPA analysis defined six hierarchical levels corresponding to clades, 1-7, 2-2, 2-7, 3-1, 3-2 and 4-1, where there is a rejection of the null hypothesis of no association between geographic distance and genetic divergence, most often indicating restricted gene flow. The value of K greater significance ($K = 4$) explains the formation of groups with the following configuration: group 1) UFAM, Adolfo Ducke Forest Reserve and Rebio Uatumã, group 2) Barcelos, PARNA Viruá and TNF Amapá, group 3) Altamira, group 4) Cruzeiro do Sul, Santa Isabel do Rio Negro, Tabatinga and Atalaia do Norte. On Bayesian analysis of population structure found that the best value of posterior probability for the formation of groups is a number equal to five. Four localities with high levels of genetic variability for mtDNA: RF Adolpho Ducke, Rebio Uatumã, UFAM and Acre. The segments of the 16S and Control Region (central part) were slightly conserved, which affect the number of segregating sites and reduced numbers of haplotypes found in populations of *P. bicolor*. By means of genetic distances, we find that there is a greater differentiation between pairs of localities in the Central Amazon, the Guyana Shield and the Brazilian Shield in relation to the western Amazonian localities. Therefore, our results indicate that possibly the populations of *P. bicolor* show a pattern of differentiation mediated by isolation by distance in view of the large geographic distances between locations found. However, additional sampling should be undertaken to provide more precise information on this pattern of differentiation.

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1 Considerações Gerais	1
1.2 Biologia de <i>Phyllomedusa bicolor</i>	2
1.3 O uso do kampo e sua importância para a biotecnologia.....	5
1.4 O DNA mitocondrial como ferramenta genética.....	7
2. Hipóteses	11
3. Objetivos	11
3.1 Objetivo Geral.....	11
3.2 Objetivos Específicos.....	11
4. Material e Métodos	12
4.1 Amostragem	12
4.2 Extração de DNA e amplificação via PCR.....	14
4.3 Purificação, sequenciamento e edição das sequências.....	15
4.4 Polimorfismo molecular.....	16
4.5 Teste de Neutralidade e equilíbrio genético.....	17
4.6 Estrutura populacional.....	17
4.7 Análises das frequências e distribuição dos haplótipos de <i>P. bicolor</i>	18
4.8 Análise espacial de variância molecular e análise Bayesiana de estruturação genética.....	19
5. Resultados	21
6. Discussão	36
6.1 Diversidade genética em <i>Phyllomedusa bicolor</i>	36
6.2 Análise da estrutura genética populacional e fluxo gênico.....	38
7. Conclusão	44
8. Referências Bibliográficas	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Macho de <i>Phyllomedusa bicolor</i>	3
Figura 02: Distribuição geográfica de <i>P. bicolor</i>	4
Figura 03: a) Espécime de <i>P. bicolor</i> no momento de coleta da secreção, b) Índio brasileiro Mayoruna com cicatrizes após a aplicação do kampô.....	6
Figura 04: Locais de amostragem de <i>Phyllomedusa bicolor</i>	12
Figura 05: Árvore filogenética não enraizada com base no modelo de Mínima Evolução gerada pelo método de Kimura 2 parâmetros.....	26
Figura 06: Cladograma dos 31 haplótipos identificados em <i>P. bicolor</i>	29
Figura 07: Gráfico em barras gerado pela análise implementada no Programa BAPS (<i>Bayesian Analysis of Population Structure</i> versão 5.1).....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Localidades de coleta e seus respectivos tamanhos amostrais.....	13
Tabela 02: Iniciadores (<i>primers</i>) utilizados na amplificação e no sequenciamento das regiões 16S e Região Controle do DNA mitocondrial.....	15
Tabela 03: Frequência dos haplótipos das regiões concatenadas do DNAm (16S e Região Controle) de <i>Phyllomedusa bicolor</i>	21
Tabela 04: Índices de diversidade genética e testes de neutralidade seletiva.....	24
Tabela 05: Matriz mostrando os valores de Φ_{ST} das comparações entre os pares de populações de <i>Phyllomedusa bicolor</i> (abaixo da diagonal). Acima da diagonal encontram-se os números efetivos de fêmeas migrantes por geração (<i>N_{emf}</i>).....	27
Tabela 06: Resultado das análises do agrupamento dos clados (NCPA) em <i>P. bicolor</i> , mostrando os valores das distâncias dos clados (<i>D_c</i>), distâncias dos clados agrupados (<i>D_n</i>) e distância dos clados interiores versus ponta (<i>I-T</i>).....	30
Tabela 07: Estimativa da divergência evolutiva sobre pares de sequências entre as localidades. Os resultados são baseados em comparações par a par de 117 indivíduos agrupados em suas respectivas localidades, A análise foi conduzida utilizando o método evolutivo Kimura 2-parâmetros no programa MEGA 4.0.....	32
Tabela 08: Probabilidade posterior da formação de grupos gerada através do programa SAMOVA apresentado a porcentagem de variação entre os grupos testados na análise de estruturação estão presentes nesta tabela somente os valores de <i>K</i> que obtiveram as maiores variações e valores de <i>F_{ct}</i> significantes.....	33
Tabela 09: Agrupamentos de populações suportados pelo programa BAPS 5.1; este arranjo de agrupamentos populacionais é apoiado por uma probabilidade posterior de 0.918.....	34

1. Introdução

1.1 Considerações Gerais

A subfamília Phyllomedusinae, que compõe um grupo particularmente sul-americano, possui algumas espécies que despertam atenção pela produção de várias substâncias biologicamente ativas em suas secreções cutâneas, as quais podem ser empregadas na proteção contra o desenvolvimento de microorganismos patogênicos, na defesa passiva contra ataque de animais carnívoros e ainda como feromônios (Schwartz et al. 2007). Algumas substâncias de característica peptídica já foram isoladas da espécie *Phyllomedusa bicolor*, como a dermofina (Negri 1992), a deltorfina (Daly et al. 1992) e a phylloxina (Chen et al. 2005; Pierre et al. 2000).

A secreção produzida pelo tegumento de *P. bicolor* é utilizada por povos indígenas residentes na Amazônia Ocidental, em rituais de proteção contra doenças e na preparação para a caça (Daly et al. 1992). Hoje, a chamada “vacina do sapo” é utilizada também por seringueiros e vem sendo aplicada por alguns curandeiros nas cidades de Cruzeiro do Sul e Rio Branco, no Estado do Acre. A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) proíbe o uso do kampô e tal proibição está regulamentada por meio da RE número 08, de 29 de ABRIL de 2004, que considera ausência de comprovação científica garantindo qualidade, segurança e eficácia dessa substância.

O conhecimento biológico de *P. bicolor* é de fundamental importância para o estabelecimento de novas pesquisas que viabilizem o uso das substâncias encontradas em sua secreção, pois o ritmo de desenvolvimento de cadeias produtivas que usam espécies da biodiversidade amazônica é frenético, e avança em velocidade muito maior que o conhecimento a seu respeito. Isto pode ter efeitos negativos drásticos sobre a conservação das espécies economicamente exploradas.

Estudos genéticos podem contribuir no entendimento da variabilidade genética desta espécie e ainda explicar qual é o grau de diversificação de suas populações na Amazônia, com vistas a um melhor conhecimento biológico de *P. bicolor*.

1.2 Biologia de *Phyllomedusa bicolor*

A família Hylidae possui três subfamílias e uma dessas em especial, chamada de Phyllomedusinae, se distribui extensamente do México à Argentina, e constitui uma das linhagens filogenéticas mais distintas dentre os hílideos neotropicais, principalmente pela sua pupila vertical, um colorido dorsal sempre verde com cores vivas nas partes ocultas, por depositarem seus ovos em uma massa gelatinosa sobre folhas ou em folhas enroladas acima da água e por diferirem nas aminas e polipeptídios que possuem na pele (Caramaschi & Cruz 2002; Faivovich et al. 2005). Esta subfamília possui 7 gêneros (*Agalychnis*, *Cruziohyla*, *Hylomantis*, *Pachymedusa*, *Phasmahyla*, *Phrynomedusa* e *Phyllomedusa*) que compreendem 58 espécies (Frost 2010). O gênero tipo desta subfamília é o gênero *Phyllomedusa* que é o mais diverso em número de espécies possuindo o total de 32 espécies (Frost 2010). Este gênero se distribui pela Costa Rica, Panamá, por algumas vertentes do Oceano Pacífico, pela Colômbia e América do Sul a leste dos Andes, incluindo Trinidad, em direção ao Sul até o norte da Argentina e Uruguai (Frost 2010).

O gênero *Phyllomedusa* possui algumas características exclusivas como dedos e artelhos com membranas interdigitais grandemente reduzidas ou ausentes; primeiro artelho mais curto, igual ou mais longo que o segundo; pele lisa ou rugosa, com ou sem osteodermes; íris uniformemente branco-prateada a bronze com reticulações pretas, dentre outras características (Caramaschi & Cruz 2002).



Figura 01: Macho de *Phyllomedusa bicolor* oriundo da Reserva Florestal Adolpho Ducke em Manaus.

Phyllomedusa bicolor (Figura 01) é a espécie tipo do gênero, e é conhecida popularmente como kampô ou kambô. Também é chamada de sapo arborícola bicolor ou sapo macaco gigante, porque é a maior espécie em tamanho dentro da subfamília Phyllomedusinae, medindo até 135 mm (Lescure & Marty 2000). O nome do gênero é derivado do Grego “phyllo”, significando folha ou folhagem, e “medusa” significando rainha ou protetora (Caramaschi & Cruz 2002). Portanto, seria a rainha ou protetora da folhagem, fazendo alusão ao seu grande tamanho e seu hábito arborícola. *P. bicolor* tem o dorso verde escuro e o ventre varia de branco a creme, possui manchas brancas com molduras escuras na região labial inferior, no peito, nos membros e nos lados do corpo. Os dedos dos membros anteriores são esbranquiçados com grandes discos adesivos verdes nas pontas; possui glândulas grandes e alongadas situadas atrás dos olhos que se estendem por cima do tímpano e pupila vertical acinzentada (Rodriguez & Duellman 1994; Lima et al. 2006). Outras características importantes para o reconhecimento são: borda posterior do tímpano oculta por uma tampa glandular que vai até o canto da mandíbula; dobra dorso-lateral também glandular e espessa em forma de “m” e número de apêndices dérmicos da articulação tibiotarsiana.

Phyllomedusa bicolor difere de outras espécies do mesmo gênero pelo seu grande tamanho, pela ausência de articulações tibiotarsianas, pela presença de grandes glândulas dorsolaterais (que vão até a região da virilha) e por suas manchas creme na parte inferior do corpo (Rodriguez & Duellman 1994; Lescure & Marty, 2000; Lima et al. 2006).

Phyllomedusa bicolor ocorre na América do Sul, com ampla distribuição na Amazônia (Figura 02). Possui hábito noturno e vive em florestas de mata primária, corriqueiramente encontrada próximo a poças isoladas em áreas planas e altas (“platôs”) ou em margens de riachos ou igarapés.

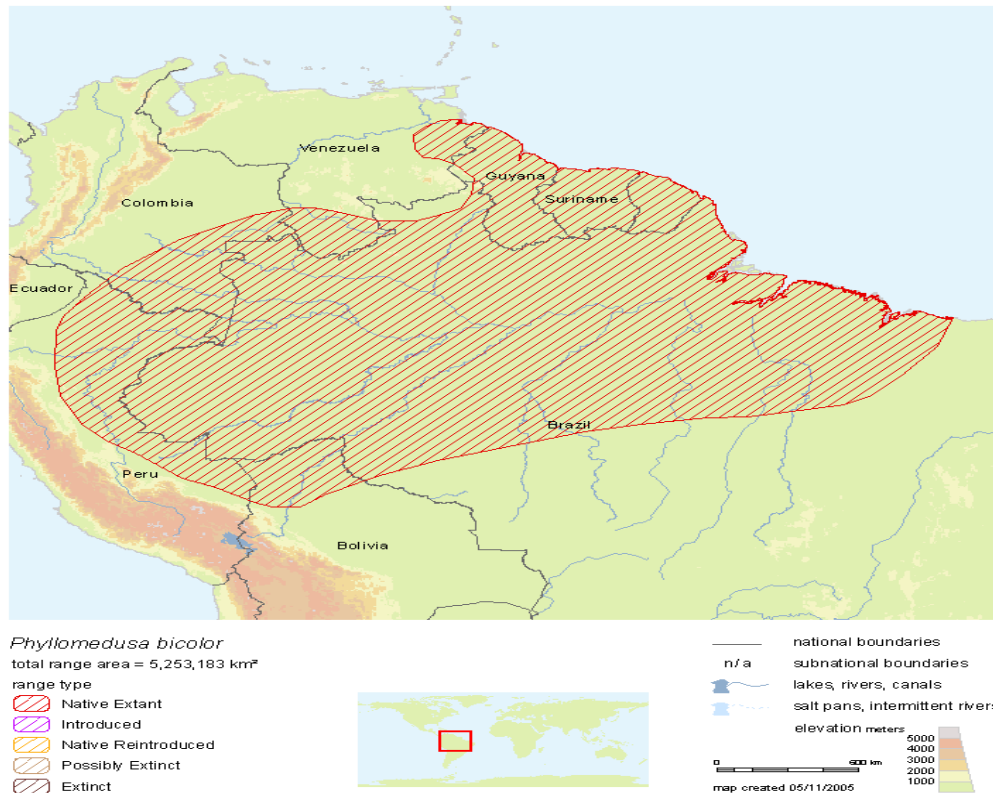


Figura 02: Distribuição geográfica da espécie *P. bicolor*. Fonte: <http://www.globalamphibians.org/> acessado em 02/10/2008.

Os machos de *P. bicolor* apresentam territorialidade com um grau de permanência observado de 35 dias no sítio reprodutivo (Freitas & Amaral 2004). Eles emitem suas vocalizações para as fêmeas do alto das árvores (um “bok” grave e bastante sonoro, as vezes seguido por um rugido "Hon-Hon") , e normalmente descem de 1 a 3 metros acima da poça para entrarem em amplexo e desovarem (Lescure & Marty 2000; Lima et al. 2006). Segundo Zimmerman & Rodrigues (1990) e Lima et al. (2006), *P. bicolor* se reproduz o ano inteiro com um pico reprodutivo nos meses de novembro a maio. As fêmeas depositam em média mais de 800 ovos brancos (Neckel-Oliveira & Wachlevski, 2004), junto com uma massa gelatinosa, em folhas dobradas ou justapostas (com auxílio do macho), acima de uma poça d’água (Lescure & Marty 2000). Nesse ninho arborícola, os ovos completam seu desenvolvimento até o estágio 25, o qual constitui a forma de girino. Essa fase dura

cerca de 8 a 10 dias podendo chegar até 11 dias e meio (Neckel-Oliveira & Wachlevski 2004), quando os girinos caem na poça. Os girinos possuem o corpo com coloração laranja transparente e o ventre prata; e vivem em grupos nos quais completam seu crescimento até a metamorfose (Lescure & Marty 2000; Lima et al. 2006).

1.3 O uso do kampô e sua importância para a biotecnologia

A secreção tegumentar da espécie *P. bicolor*, produzida por grandes glândulas na parte dorsal do animal, é usada por indígenas do grupo lingüístico *Pano* na Amazônia Ocidental, sobretudo pelos Katukina, Kaxinawá e Jaminawa dos vales do Acre e Alto Purus, e ainda pelos Marubo e Mayoruna (Matsés) do Vale do Javari, no sudoeste do estado do Amazonas. Essa espécie é muito importante para os indígenas que habitam essa região da Amazônia, pois eles utilizam esta secreção para rituais de pajelança. Segundo Gordo et al. (2005) os índios da tribo Matses que vivem no Peru capturam indivíduos de *P. bicolor* em árvores próximas a poças d'água, utilizando-os em um ritual no qual amarram o espécime pelas pernas deixando-os estirados sobre fogo brando (Figura 03 a). Em seguida, cospem de duas a três vezes no animal para que este se irrite e elimine a secreção (Daly 1992). Essa secreção é mantida em palitos ou pedaços de madeira nos quais ressecam e posteriormente são reidratados para a aplicação da “vacina do sapo” como é conhecida no Acre e em outros centros urbanos.

Assim como os Matses, os índios Katukinas localizados no Acre usam da mesma forma o kampô, coletando os indivíduos e retirando sua secreção. Eles acreditam que a secreção do kampô pode livrá-los de condições negativas, como o azar na caça, indisposições e "preguiça" (Lima 2008). Os índios que utilizam o kampô realizam a aplicação da secreção queimando a pele (no braço ou no peito) com um pequeno cipó em brasa (Figura 03 b), em seguida passam a secreção (previamente umedecida) nessas queimaduras (Daly 1992). Depois de alguns minutos, o kampô começa a agir no organismo causando pulsação rápida, sudorese, incontinência e vômitos (que perduram por cerca de 20–30 min). Seguidos então por um estado de letargia e finalmente por um estágio de euforia aliada a uma sensação de que os sentidos estão aguçados (Daly 1992; Gordo et al. 2005).



a)



b)

Figura 03: a) Espécime de *P. bicolor* no momento de coleta da secreção (fonte: www.amazonlink.org); b) Índio brasileiro Mayoruna com cicatrizes após a aplicação do kampo (fonte: Daly, 1999).

Em centros urbanos como Rio Branco e Cruzeiro do Sul, estado do Acre, São Paulo e Curitiba, existem diversos aplicadores dessa chamada “vacina de sapo” como índios, seringueiros, ex-seringueiros e até médicos, apesar da proibição da ANVISA (citada anteriormente). Tal proibição se apóia no fato de não haver comprovação científica que garanta seu uso, qualidade e eficácia das substâncias contidas na secreção. Nesta resolução, foi determinado que fosse suspenso o uso da “vacina” em todo território nacional até que se comprove sua eficácia e se tenha garantias de que as substâncias contidas na secreção não sejam maléficas a saúde.

As secreções da pele dos anfíbios são conhecidas como uma rica fonte de moléculas biologicamente ativas, a maioria das quais são alcalóides, amins biogênicas e peptídeos (Brand et al. 2002). Um grupo de peptídeos opióides tem sido descoberto na pele de pererecas sul-americanas da subfamília Phyllomedusinae (Richter et al. 1990). As dermaseptinas são uma classe de

peptídeos anti-microbiológicos que estão presentes nas secreções de pele de pererecas do gênero *Phyllomedusa* (Brand et al. 2002).

Em 1992, Daly e colaboradores identificaram uma substância retirada da secreção de *P. bicolor* originária do Peru, a qual tem a característica de ser um peptídeo vasoativo e foi chamada de adenoregulina, além disso, também foram encontrados nesse trabalho substâncias como o peptídeo vasoativo sauvagina e peptídeos opióides. Nesse trabalho foi observado que quando a secreção foi aplicada em ratos, estes entravam em um estado de letargia ou apatia duradoura. Nos humanos os efeitos produzidos pela adenoregulina ainda são incertos.

Negri et al. (1992) verificaram o poder de outra substância da secreção epidérmica de *P. bicolor* conhecida como dermofina também da classe dos peptídeos opióides. Testada em ratos, essa substância causa um estado de catalepsia e seu efeito analgésico superou o efeito da morfina mostrando-se um super analgésico. Outra substância, a deltorfina, a qual foi isolada da secreção epidérmica de *P. bicolor* por Erspamer et al. 1989 foi descrita como uma substância parecida com a dermofina mostrando ter alta afinidade pelo mesmo receptor.

Um novo peptídeo antibiótico foi isolado da secreção epidérmica de *P. bicolor*, este foi chamado de phylloxina e corresponde a um peptídeo biologicamente ativo derivado de domínios variáveis que incluem o domínio da dermaseptina (Pierre et al. 2000). Esta substância teve ação antimicrobiana em algumas bactérias gram-positivas e gram-negativas (Pierre et al. 2000). Esses dois tipos de peptídeos opióides parecem estar envolvidos em alguns dos efeitos produzidos pela “vacina do sapo”.

1.4 O DNA mitocondrial como ferramenta genética

Os marcadores moleculares são amplamente empregados para estimar parâmetros genéticos, assim como o fluxo gênico e o grau de diferenciação dentro e entre as populações (Bert et al. 2002). Entre os marcadores de DNA mais utilizados nos últimos anos para estudar os níveis e padrões de distribuição de variabilidade genética entre populações de espécies animais, destaca-se o DNA mitocondrial (DNAMt), cuja herança é predominantemente materna e não ocorre recombinação, por se tratar de um DNA haplóide (Awise, 2000). Em vertebrados, o DNAMt é uma

molécula circular com 37 genes codificadores: 13 genes que codificam proteínas relacionadas à função mitocondrial; 22 RNAs de transferência; 2 RNAs ribossomais; além de uma região não codificadora chamada de região controle (Avisé et al. 1986; Meyer 1993). Quanto aos genes, há ausência de sequências não codificadoras (íntrons), sendo o DNAmít geralmente conservado no tamanho (cerca de 16 kilobases) e no arranjo dos genes (Avisé et al. 1986). Em hílídeos é estimado um tamanho que varia de 15,5 a 18,4 Kb para *Hyla cinerea* e de 18 a 18,9 Kb para *H. gratiosa* (Bermingham 1986). O tamanho é relativamente estável para todos os animais, variando de 16 a 21 Kb (Ray & Densmore, 2002).

Uma das vantagens em usar o DNAmít em estudos populacionais e filogenéticos é que ele possui uma elevada taxa de evolução (mutação), sendo de 5 a 10 vezes maior (1×10^{-8} substituição / sítio / geração) do que os genes codificadores de proteínas do DNA nuclear (Brown et al. 1982; Li 1997). O DNAmít é também muito utilizado devido à facilidade em isolá-lo, ao grande número de cópias por célula, seu tamanho pequeno e por sua organização simples, sendo constituído por uma molécula de DNA circular de fita dupla (Avisé et al. 1984). O DNA mitocondrial é uma ferramenta importante no estudo das relações evolutivas entre indivíduos e de distribuição da variabilidade genética entre populações de várias espécies de animais, incluindo as espécies de anfíbios (Lougheed et al. 2006; Funk et al. 2007).

Viana (2005) estudou três espécies de quelônios amazônicos do gênero *Podocnemis*: *Podocnemis unifilis*, *Podocnemis erythrocephala* e *Podocnemis sextuberculata*. Empregou o uso do DNAmít através do sequenciamento da região controle, onde foi verificado que essas espécies apresentam altos níveis de variabilidade genética. Nesse estudo as populações das três espécies, com raras exceções, não apresentaram diferenças genéticas intrapopulacionais. Porém, quando apresentavam algum tipo de diferenciação, essas envolviam a presença de barreiras geográficas, como corredeiras de rios, na espécie *P. erythrocephala*. Foram observadas que características peculiares do rio Janauacá, como pequenos canais entrelaçados e a presença de áreas semelhantes a igapós, podem estar atuando como uma barreira ao fluxo gênico na espécie *P. unifilis*. Ainda nesse estudo o autor afirma existir diferenciação nas populações de *P. unifilis* (Rio

Janauacá) e *P. erythrocephala* (Parque Nacional do Jaú) as quais devem ser consideradas como unidades de manejo diferenciadas.

Vasconcelos & Hrbek (2006) estudaram a espécie de jacaré *Caiman crocodilus* e usaram região Cyt b do DNAm em 125 indivíduos. Nesse estudo foi encontrado um total de 38 haplótipos. Foram verificados altos níveis de diversidade gênica, e que nem mesmo o efeito de mudanças climáticas e uma recente superexploração por meio da caça causaram efeito em tal diversidade. Foram encontrados níveis consideráveis de divergência genética entre localidades da bacia Amazônica e bacia extra-amazônica (Rio Uaçá, Guiana Francesa), onde o fator de diversificação mais provável de estar atuando nessa diferenciação é o isolamento por distância.

Frost et al. (2006) utilizou o DNAm em seu estudo com o intuito de testá-lo no relacionamento filogenético de toda a classe Amphibia, que inclui indivíduos da família Hylidae. Faivovich et al. (2005), por sua vez, desenvolveram uma revisão sistemática da família Hylidae com ênfase na subfamília Hylinae, com base em dados do DNAm e morfológicos. Vences et al. (2005) testaram o poder desse marcador utilizando o gene ribossômico 16S, o qual é conhecido como o “barcoding dos anfíbios”. Este trabalho mostrou que a região 16S é bastante conservada, porém mutações são comuns em algumas regiões variáveis, correspondentes a alças na estrutura do RNA ribossomal.

Em uma análise multi-caráter, Loughheed et al. (2006), avaliaram a diferenciação intraespecífica do hílideo neotropical *Dendropsophus leucophylatus* (= *Hyla leucophylata*). Ainda nesta análise foi empregado o uso da região 16S, além de dados morfológicos e ecológicos. Com os dados genéticos foi possível observar uma divisão filogenética dentro dessa espécie, porém com uma pequena estrutura geográfica.

Estudando a hipótese biogeográfica de diversificação em *Engystomops petersi* (= *Physalaemus petersi*), Funk et al. (2007) usaram o DNAm empregando o estudo da região 16S, testando as hipóteses de rios como barreiras e de gradiente elevacional. Seus resultados indicaram baixo suporte para a hipótese de gradiente elevacional, porém as análises filogenéticas revelaram que o Rio Madre de Dios (Peru) pode estar atuando como uma barreira geográfica ao fluxo gênico. Também foi na Amazônia que Austin et al. (2001), usando dados genéticos compilados das

regiões 12S e 16S do DNAm, avaliaram as relações evolutivas da espécie *Allophryne ruthveni*. Os resultados indicaram que a espécie tem maior afinidade filogenética com espécies da família Centrolenidae.

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

Em estudos populacionais, a Região Controle do DNAm pode ser aplicada, pois de todos os genes mitocondriais, a Região Controle tem a maior taxa de substituição. As taxas de evolução da Região Controle são de duas a cinco vezes mais altas do que em genes mitocondriais codificantes de proteína (Greenberg 1983) e, portanto, sofrem mutações mais rapidamente, pois correspondem a região mais variável deste genoma (Brown 1985). Em relação a anuros, Ananias (2002) testou o relacionamento filogenético entre populações de *Hypsiboas semiguttatus* (= *Hyla semiguttata*) e espécies relacionadas, utilizando a Região Controle e citocromo b do DNAm. Seus resultados indicaram a formação de dois clados monofiléticos na espécie *Hypsiboas semiguttatus* onde a população de Camará do Sul (Rio Grande do Sul – Brasil) é distinta da população de São Francisco de Paula (Rio Grande do Sul – Brasil). O autor sugeriu que *Hypsiboas pulchellus* (= *Hyla pulchella joaquina*) de Urubuci (estado de Santa Catarina - Brasil) tem maiores afinidades filogenéticas com as populações de *Hypsiboas semiguttatus* de São Francisco de Paula contrariando uma hipótese filogenética baseada em dados morfológicos. Esse estudo, dentre outros, comprovam o uso do DNAm tanto para estudos filogenéticos como para estudos filogeográficos e populacionais.

Desta forma, neste trabalho faremos uso desta ferramenta para estimar a variabilidade genética e os níveis intra-populacional e interpopulacional na espécie *P. bicolor* , por meio de duas regiões: a Região Controle e o rDNA 16S.

2. Hipóteses

H0: A espécie *Phyllomedusa bicolor* possui um alto grau de variabilidade genética em sua distribuição;

H1: Há uma baixa variabilidade genética entre as populações de *P. bicolor*;

H0: A distância genética observada entre os indivíduos das diferentes localidades está correlacionada com a localização geográfica dos espécimes;

H1: Não há qualquer tipo de correlação entre a distância genética encontrada e a localização geográfica das populações;

H0: Não há nenhum nível de estruturação genética entre as populações de *P. bicolor*;

H1: As populações amostradas do *P. bicolor* são geneticamente diferenciadas devendo portanto serem consideradas como unidades evolutivas significantes.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral:

Estimar os níveis de variabilidade genética e a estrutura genética nas populações naturais de *P. bicolor* da Amazônia brasileira.

3.2 Objetivos específicos:

- Caracterizar geneticamente as populações de *P. bicolor* nas localidades amostradas.
- Avaliar a existência ou não de unidades geneticamente diferenciadas na espécie.
- Testar se existe alguma associação entre a distância genética e a distribuição geográfica dos indivíduos provenientes de diferentes localidades na Amazônia.

4. Material e Métodos

4.1 Amostragem

As amostragens foram realizadas em localidades distribuídas em cinco estados da Amazônia brasileira como mostrados na Figura 4. No estado do Amazonas, as coletas foram feitas na Reserva Florestal Adolpho Ducke (1), Campus da Universidade Federal do Amazonas (2), na Reserva Biológica do Uatumã (3), na região de Barcelos (4), Santa Isabel do Rio Negro (9), Tabatinga (10) e Atalaia do Norte (11). No estado do Pará, foram feitas na região de Altamira (5). No estado de Roraima coletamos no Parque Nacional do Viruá, no município de Caracaraí (6). No Amapá foram realizadas coletas na Floresta Nacional do Amapá (7) e por fim no estado do Acre, na cidades de Cruzeiro do Sul e Rio Branco (8). Um total de 117 indivíduos foram obtidos em onze localidades diferentes (Tabela 01). As amostras de Cruzeiro do Sul e de Rio Branco foram consideradas nas análises como uma única localidade. Os critérios para delimitação dos locais de coleta foram a proximidade de terras indígenas ou locais que fazem uso do *kampô* e a indicação, comprovadas por estudos prévios, que demonstrassem a ocorrência da espécie naquele local.

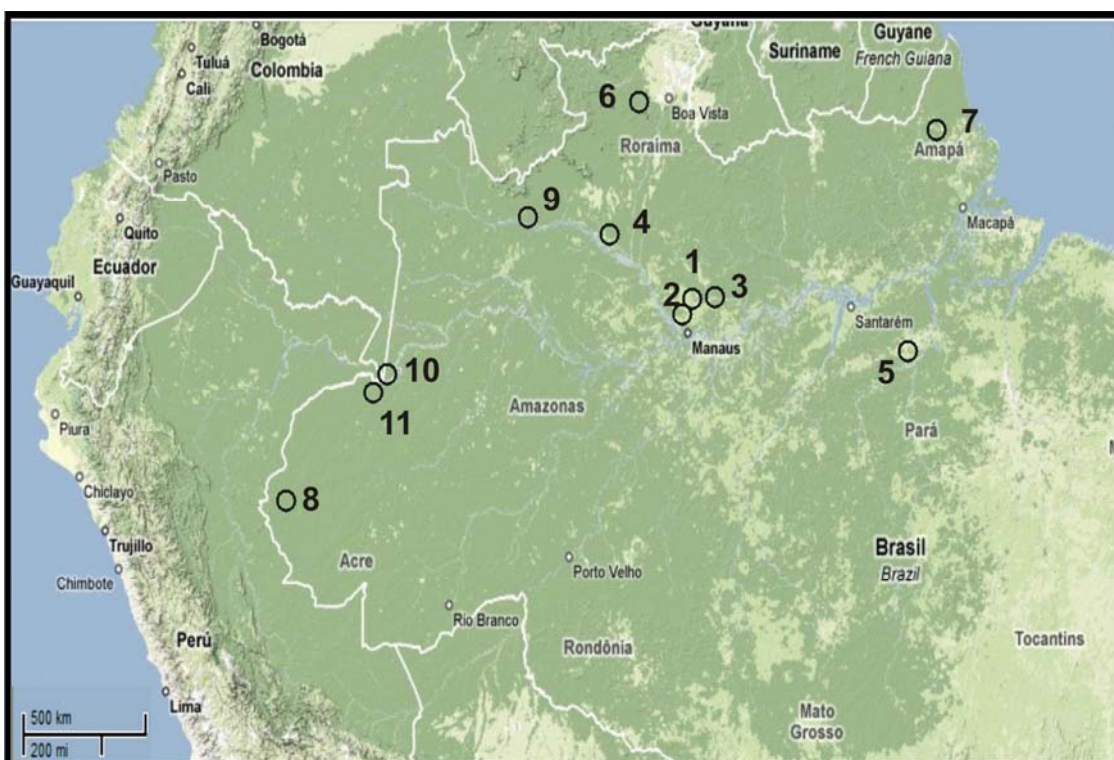


Figura 04: Locais de amostragem de *Phyllomedusa bicolor*.

As coletas foram realizadas no período noturno nas margens de poças permanentes e semipermanentes e também em poças próximas a igarapés. Em cada área foram coletados pelo menos sete indivíduos. As buscas pelos indivíduos foram realizadas por meio de encontro auditivo e posteriormente pela busca visual com o uso de lanterna de cabeça.

Tabela 01 - Localidades de coleta e seus respectivos tamanhos amostrais

Localidade	Código das localidades	Estado	Nº da localidade	Nº amostral
Reserva Adolfo Ducke	RAD	Amazonas	1	17
Campus UFAM	UFA	Amazonas	2	7
Rebio Uatumã	UAT	Amazonas	3	10
Barcelos	BAR	Amazonas	4	10
Altamira	ALT	Pará	5	13
PARNA Viruá	VIR	Roraima	6	9
FLONA Amapá	AMP	Amapá	7	7
Acre (Cruzeiro do Sul e Rio Branco)	ACR	Acre	8	14
Santa Isabel do Rio Negro	STI	Amazonas	9	9
Tabatinga	TAB	Amazonas	10	11
Atalaia do norte	ATA	Amazonas	11	10
Total				117

De cada indivíduo capturado foi coletado um dos artelhos (ponta dos dedos dos pés). Em seguida, o material foi armazenado em tubo de 2,0 mL com álcool 95%, tumbado e depositado na Coleção de Tecidos de Genética Animal – CTGA-ICB/UFAM (CGEN, Deliberação No. 75, de 26 de agosto de 2004) do Laboratório de Evolução e Genética Animal, localizado no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas. Este tipo de coleta de material biológico, que

usa o dedo todo ou parte do mesmo, é um procedimento padrão de marcação aplicado para estudos genéticos com anuros (Funk et al. 2005; Jehle et al. 2008) e, por haver corte de somente um dos artelhos de cada indivíduo, este procedimento não causa sérios danos ao animal (McCarthy & Parris 2004).

Para realizar as coletas foi feito o uso da autorização para atividades com finalidade científica (nº 16210-1 para Edvaldo Pereira Mota e 13777-2 para Albertina P. Lima) concedida pelo IBAMA através do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO.

4.2 Extração de DNA e amplificação via PCR

O processo de extração de DNA genômico foi realizado segundo o protocolo descrito por Sambrook et al. (1989). As amostras de tecido do artelho de cada indivíduo foram cortadas e colocadas em microtubos e posteriormente digeridas em uma solução contendo: 500 µL de tampão STE; 15 µL de Proteinase K à 1% e 75 µL de SDS à 10%.

Os tubos foram incubados em estufa a 55 °C até digestão total por toda a noite. Após essa etapa, o produto dessa reação passou por lavagens com clorofórmio/álcool Isoamílico (24:1), onde em seguida o DNA foi precipitado com álcool. Ao final desse procedimento, o DNA foi ressuspendido em 50 µL de água deionizada e autoclavada. O material genético extraído correspondente ao DNA genômico foi quantificado em gel de agarose 1%, sendo posteriormente comparadas a um marcador de peso molecular conhecido, com o intuito de avaliar a qualidade da extração e estimar a concentração do DNA extraído.

Após a extração e quantificação do DNA genômico, foram amplificadas as regiões que codificam o RNA ribossômico 16S e a Região Controle do DNA mitocondrial. A amplificação foi realizada via PCR (reação em cadeia da polimerase) utilizando-se um par de iniciadores (*primers*) universais 16S do DNA mitocondrial (16Sa e 16Sb; Palumbi et al. 1996) e *primers* para a Região Controle de anuros (Control IP-H e MZV 15-L; Goebel et al. 1999). Posteriormente foram desenvolvidos primers específicos que estão indicados na Tabela 02. As reações de amplificação das regiões 16S e Região Controle tiveram o volume final de 15 µL contendo 5,5 µL de água deionizada e autoclavada, 1,5 µL de dNTPs (1,5 mM); 1,5 µL de Tampão 10X (Tris-HCL 100 mM, KCl 500 mM); 1,5 µL de cada *primers* (0,2 µM), 1,5 µL

MgCl₂ (25 mM); 1 µL de DNA (cerca de 10ng) e 0,3 µL de Taq DNA polimerase. Os ciclos de amplificações foram realizados usando-se as seguintes condições: (1) desnaturação inicial a 92°C por 1 minuto; (2) 35 ciclos que consistiram em desnaturação a 92 °C por 1 minuto, anelamento dos *primers* a 50°C por 40 segundos, e extensão a 72°C por 1,5 minutos e (3) uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

Tabela 02 - Iniciadores (*primers*) utilizados na amplificação e no sequenciamento das regiões 16S e Região Controle do DNA mitocondrial

Iniciadores	Sequência Nucleotídica	Autores
16S A**	5'– CGCCTGTTTATCAAAAACAT – 3'	Palumbi et al. (1996)
16S B**	5' – CCGGTCTGAACTCAGATCACGT – 3'	Palumbi et al. (1996)
Control IP-H**	5' – GTCCATTAGATTCATTCCGTCAG – 3'	Goebel et al. (1999)
MZV 15-L*	5' – GAACTAATGGCCACACWWTACGNA – 3'	Moritz et al. (1992)
Phy-L**	5' – GCATTTGTAGGCTACGTTCTCC – 3'	Presente estudo
PhyloR2-560*	5' – TGGCTAGAGGGCGAAATATG – 3'	Presente estudo
PhyloF2-110*	5' – GCCACCCTAACTCGATTCTTC – 3'	Presente estudo

Nota: * utilizados somente para a amplificação, ** utilizados tanto na amplificação quanto no sequenciamento.

Em seguida, a amplificação foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 1% em comparação a um marcador de 1kb para assim estimar o tamanho dos fragmentos obtidos.

4.3 Purificação, sequenciamento e edição das sequências

Os produtos de PCR foram submetidos à purificação com as enzimas exonuclease e fosfatase alcalina, de acordo com as especificações do fabricante (GE - Healthcare) para retirada de restos de *primers* e moléculas de baixo peso molecular, como por exemplo nucleotídios não incorporados durante a reação de amplificação. Após essa etapa foi realizada a reação de sequenciamento utilizando-se 2 µL de DNA purificado, 2 µL de cada *primer*, 2,5 µL de tampão Big Dye, 0,5 de Big Dye terminator (*cycle sequencing kit da Applied Biosystems*). Os iniciadores utilizados nas reações de sequenciamento da região 16S foram somente aqueles

publicados por Palumbi et al. (1996). Já para a Região Controle primeiramente foram utilizados os iniciadores desenvolvidos para anuros publicados por Goebel et al. (1999). Depois da obtenção das primeiras sequências desta região foram desenhados três *primers* específicos para a espécie estudada, sendo que dois foram selecionados e usados tanto para as reações de amplificação quanto no sequenciamento como já foi mostrado na Tabela 02.

A etapa seguinte incluiu a precipitação das amostras purificadas com a utilização do protocolo de etanol/EDTA finalizando com o sequenciamento das amostras em sequenciador automático ABI 3130xl (*Applied Biosystems*).

Após a leitura das sequências pelo sequenciador, estas foram editadas no programa Bioedit (Hall 1999) o qual foi possível através das homologias dos sítios entre os indivíduos estabelecer um alinhamento inicial. Para completar o alinhamento múltiplo das sequências foi utilizado o programa CLUSTAL W (Thompson et al. 1994) o qual forneceu a base para a construção de uma matriz de dados contendo todas as sequências nucleotídicas. Este programa auxilia o alinhamento de modo a deixar as sequências livres para inspeção visual de erros.

4.4 Polimorfismo molecular

Para analisar o polimorfismo molecular nas sequências do DNAm_t das populações de *P. bicolor*, duas medidas de diversidade genética foram utilizadas: a diversidade gênica e a diversidade nucleotídica. A diversidade gênica ou diversidade haplotípica (h) é a probabilidade de duas sequências escolhidas aleatoriamente de uma população serem diferentes (Li 1997). Esta medida de polimorfismo é equivalente ao nível de heterozigose esperada, quando se trata de marcador com herança co-dominante (dados diplóides). O número de nucleotídeos diferentes por sítio entre sequências escolhidas aleatoriamente define outro parâmetro utilizado para análise de polimorfismo molecular, a diversidade nucleotídica (π), que é equivalente à diversidade gênica, mas no nível nucleotídico (Tajima 1983; Nei 1987). Neste trabalho essas duas medidas foram calculadas utilizando os programas ARLEQUIN 3.0 (Excoffier et al. 2005) e DNASP 4.00 (Rozas et al. 2003).

4.5 Teste de Neutralidade e equilíbrio genético

No presente estudo foram utilizados dois testes: o teste D de Tajima (Tajima 1989) e o F_s de Fu (Fu 1997). O primeiro teste se baseia no modelo dos sítios infinitos sem recombinação (Kimura 1969), apropriado para sequências curtas de DNA. O modelo dos sítios infinitos assume que os sítios ao longo de uma sequência de DNA sofrem mutações independentes e irregulares e que a probabilidade de um mesmo sítio sofrer mutações duas vezes é infinitamente pequena. O segundo teste, também baseado no modelo dos sítios infinitos sem recombinação, leva em consideração o fator temporal das mutações que geram sítios polimórficos, classificando-as como antigas e recentes. Este modelo é aplicável principalmente quando há excesso de mutações jovens (mutações que ocorreram recentemente, com baixa frequência e que geram excesso de alelos ou haplótipos raros).

Esses dois testes (teste D de Tajima e F_s de Fu) também foram usados para detectar mudanças demográficas nas populações causadas por eventos históricos como, por exemplo, expansões populacionais. Para o cálculo destes testes utilizou-se o programa ARLEQUIN 3.0 (Excoffier et al. 2005).

4.6 Estrutura populacional

A análise de variância molecular (AMOVA, Excoffier et al. 1992) implementada no programa ARLEQUIN 3.0 (Excoffier et al. 2005), foi utilizada para se detectar a presença e o nível de diferenciação entre indivíduos de diferentes localidades. Esta análise é uma estimativa de estrutura genética populacional similar a outras abordagens que levam em conta a variação na frequência gênica entre os haplótipos. Os indivíduos são agrupados hierarquicamente em populações e as populações são incluídas em grupos definidos *a priori*, com base em critérios não genéticos como geográficos, ecológicos, ambientais, etc. A AMOVA estima os componentes de covariância e calcula o Φ_{ST} , o qual é análogo ao F_{ST} (Weir & Cockerham 1984).

Utilizamos novamente o programa ARLEQUIN 3.0 (Excoffier et al. 2005) para realizar comparações dos valores de Φ_{ST} par a par entre as localidades amostradas afim de desvendar o padrão de estruturação de cada uma das localidades. Assim, foi possível estimar indiretamente os valores do número efetivo de fêmeas migrantes por geração (N_{mf}).

A correlação entre a distância genética (Φ_{ST}) e geográfica foi realizada pelo teste de Mantel (Mantel 1967) através de ferramentas disponíveis no software ARLEQUIN 3.0 (Excoffier et al. 2005). A significância dos valores foi avaliada por testes de permutação (10000 replicações).

Usando o programa MEGA 4.0 (Tamura et al. 2007) foi gerada uma árvore filogenética não enraizada pelo método de Evolução Mínima seguindo o modelo de evolução Kimura 2 parâmetros. Esta árvore visou observar se os grupos encontrados correspondem a grupos monofiléticos. Ainda utilizando o programa MEGA 4.0 foi calculada uma estimativa da divergência evolucionária sobre pares de sequências entre grupos e este método foi conduzido também pelo modelo evolutivo Kimura 2 parâmetros com a finalidade de verificar a taxa de divergência entre os grupos de populações de *P. bicolor*.

4.7 Análises das Frequências e Distribuição dos Haplótipos de *P. bicolor*

Após a edição de todas as sequências e criadas as matrizes de dados, essas foram usadas para estimar os cladogramas intra-específicos não enraizados de haplótipos, com o uso do critério da máxima parcimônia (95%), produzindo topologias que representam os agrupamentos (*clusters*) dos haplótipos (conjunto de sequências nucleotídicas idênticas de um segmento de DNA, quando se trata de genoma haplóide). Esta rede de haplótipos foi obtida pelo programa TCS 1.21 (Clement et al. 2000), um *software* que agrupa sequências dentro de haplótipos e calcula a frequência dos mesmos nas localidades amostradas estimando relações genealógicas entre elas, baseando-se em um algoritmo descrito por Templeton, Crandall & Sing (1992). Para resolver os *loops* que essa rede de haplótipos apresentou foi gerada uma árvore filogenética desenvolvida pelo método de máxima verossimilhança, usando o modelo HKY implementado no programa TREEFINDER (Jobb et al. 2004) onde foi verificado o relacionamento filogenético dos haplótipos encontrados e assim decidiu-se sem ambigüidade as conexões entre esses haplótipos na rede produzida pelo programa TCS.

Foi realizada a Análise Filogeográfica de Clados Agrupados (*Nested Clade Phylogeographical Analysis*, NCPA; Templeton 2001 e 2004) para converter a árvore dos haplótipos em um agrupamento hierárquico de conexões agrupadas, ou clados, usando as regras descritas por Templeton et al. (1987) e Templeton & Sing (1993).

Essas análises foram desenvolvidas utilizando o programa ANECA (Panchal 2007) o qual possui em sua plataforma os programas TCS v. 1.18 (Clement et al. 2000) e GEODIS v. 2.2 (Posada et al. 2000) incluindo ainda uma interpretação da chave de inferência de Templeton et al. (2005), de forma que todo o processo é automatizado.

Os agrupamentos hierárquicos formados forneceram informações para testar se existe alguma associação significativa entre os níveis dos cladogramas dos haplótipos e sua localização geográfica através de uma análise de contigência (Templeton & Sing 1993). Por meio desta metodologia foi possível verificar se houve eventos histórico-demográficos, como subestruturação populacional, e inferir quais foram os fatores que estiveram associados a essa subestruturação (formação de barreiras geográficas, colonização, dispersão e efeito de gargalo populacional ou a mistura desses fatores). O método pode ainda verificar se há uma relação significativa da distribuição dos haplótipos em relação a distribuição geográfica (Templeton 1995). Uma vantagem dessa metodologia é que não há necessidade de formação de grupos pré-estabelecidos (como agrupar amostras por uma determinada área geográfica). Através dos dados produzidos pelo NCPA pode-se identificar a formação de determinados grupos (*a posteriori*), sua eventual associação à distribuição geográfica e ainda inferir se essa associação resulta de algum nível de fluxo gênico restrito entre as populações. Além disso, este é o único método de análise filogeográfica que tem sido validado por uma série de dados de controles positivos que envolvem um elevado número de espécies, escala geográfica e esquemas de amostragem (Templeton 2008).

4.8 Análise espacial de variância molecular e análise Bayesiana de estruturação genética

A análise espacial de variância molecular (SAMOVA) agrupa populações geograficamente homogêneas em um número definido (K) pelo usuário dos grupos, de modo que a proporção de variância genética total observada entre grupos (índice F_{ct}) é maximizada. Essa análise foi aplicada com a finalidade de descobrir a formação de grupos biológicos *a posteriori*, pois agrupa populações que são geograficamente homogêneas (Dupanloup et al. 2002). Várias SAMOVAs foram computadas, variando-se o número K (números de grupos testados) de 2 a 10, até que o valor de F_{ct} ficasse relativamente constante. Para cada valor de K, 10000

simulações foram desenvolvidas para cada grupo, sendo que essa análise também foi computada utilizando o programa SAMOVA (Dupanloup et al. 2002).

A presença de estruturação genética também foi avaliada por um método bayesiano usando o programa BAPS (*Bayesian Analysis of Genetic Population Structure*) versão 4.14 (<http://web.abo.fi/fak/mnf//mate/jc/software/baps.html>), desenvolvido por Corander et al. (2003), onde o número de populações foi tratado como “não conhecido” e estimado *a posteriori*. Este método que visa à formação de grupos biológicos, utiliza um algoritmo Bayesiano para estimar a distribuição das frequências alélicas de todas as populações, essas diferenças nas frequências alélicas não-significantes são recalculadas assim como as distribuições usando as populações combinadas. Na análise foi calculada, uma probabilidade posterior, a partir de todos os indivíduos agrupados, que foi usada para escolher o melhor valor do número de grupos na partição ideal (números de *clusters*) através da análise de mistura de populações com a verificação de agrupamentos de indivíduos.

5. Resultados

O banco de dados para as análises populacionais foi composto de 117 sequências nucleotídicas, cada uma com um total de 1037 pares de bases (pb) resultante de dados concatenados para o DNAm (sendo um fragmento de 16S de 520 pb e um fragmento da Região Controle de 517 pb). A composição média das bases nucleotídicas que compõe os dois fragmentos concatenados correspondeu a: 31,68% para Timina, 26,71% para Adenina, 25,15% para Citosina e 16,45% para Guanina, apresentando um padrão esperado de composição nucleotídica que já foi observado para o grupo dos anuros (Lougheed et al. 1999).

A partir de todas as sequências analisadas foram observados um total de 38 sítios polimórficos e 999 sítios monomórficos. Dentre os sítios que variaram, em 31 foram observados mutações do tipo transição e em sete, do tipo transversão.

Foram observados 31 haplótipos, sendo que 21 destes foram únicos dentro da amostragem. O haplótipo H1 (Tabela 03) apresentou a maior frequência na distribuição geográfica, com um total de 30 ocorrências na Amazônia Central (Reserva Florestal Adolfo Ducke, UFAM, Rebio Uatumã) e escudo das Guianas (PARNA do Viruá e FLONA do Amapá) correspondendo a aproximadamente 28% do total de haplótipos identificados.

Tabela 03 - Frequência dos haplótipos das regiões concatenadas do DNAm (16S e Região Controle) de *Phyllomedusa bicolor*

Haplótipos	Populações											Total
	RAD (1)	UFA (2)	UAT (3)	BAR (4)	ALT (5)	VIR (6)	AMP (7)	ACR (8)	STI (9)	TAB (10)	ATA (11)	
H1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
H2	5	1	2	10	-	8	4	-	-	-	-	30
H3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
H4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
H5	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
H6	4	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-	14
H7	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
H8	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
H9	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2

H10	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
H11	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
H12	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
H13	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
H14	-	-	-	-	12	-	-	-	-	-	-	12
H15	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
H16	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1
H17	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
H18	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	2
H19	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	3
H20	-	-	-	-	-	-	-	2	7	2	8	19
H21	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
H22	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	3
H23	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
H24	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	2
H25	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
H26	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
H27	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
H28	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
H29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	4
H30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	1	6
H31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
Total	17	7	10	10	13	9	7	14	9	11	10	117

Nota: RAD= Reserva Florestal Adolfo Ducke, UFA = UFAM, UAT = Rebio Uatumã, BAR = Barcelos, ALT = Altamira, VIR = PARNA do Viruá, AMP = FLONA do Amapá, ACR = Cruzeiro do Sul, STI = Santa Isabel do Rio Negro, TAB = Tabatinga, ATA = Atalaia do Norte.

Os níveis de variabilidade genética intrapopulacionais foram estimados com base nos parâmetros genéticos e nas análises de polimorfismo de DNA que estão sumarizados na Tabela 04. A diversidade gênica (h) total foi estimada em 0,884, sendo que este valor é elevado quando comparado aos valores da maioria das

localidades amostradas. Há uma enorme variação neste índice onde a menor diversidade gênica foi 0,000 referente à localidade de Barcelos e a maior foi de 0,912 obtida para a população do Acre. O índice de diversidade nucleotídica (π) também foi calculado para todas as localidades amostradas, correspondendo a média de 0,0083. Quando as populações foram analisadas separadamente a diversidade nucleotídica variou de 0.0000 em Barcelos a 0,0037 na Reserva Florestal Adolfo Ducke.

Para este estudo as estimativas de polimorfismo genético indicaram diferentes níveis de variabilidade genética ao longo da área de distribuição amostrada desta espécie.

Para os testes de neutralidade seletiva de mutações, o teste D de Tajima (Tajima, 1989) e F_s de Fu (Fu, 1997), não apresentaram valores significantes, (não tiveram o valor de $P < 0,05$), o que sugere que as populações de *P. bicolor* estão em equilíbrio genético, não demonstrando expansão populacional e nenhum tipo de seleção.

O teste de AMOVA revelou que há uma forte estruturação genética, a qual é apoiada significativamente pelo índice de fixação ($\Phi_{ST} = 0,8166$; $P < 0,001$). Os resultados desta análise sugerem que a maior parte da variação genética (81,66%) está distribuída entre as populações e que 18,34% dessa variação ocorre dentro das populações. Analisando o índice de diferenciação Φ_{ST} para cada localidade separadamente, os valores indicaram forte estruturação para todas as localidades, apresentando pequena variação neste índice, de 0,79 na R. F. Adolpho Ducke a 0,83 em três localidades (Barcelos, Altamira e PARNA do Viruá).

Tabela 04- Índices de diversidade genética e testes de neutralidade seletiva, onde N= n° amostral, NH= n° de haplótipos, S= n° de sítios polimórficos, h = diversidade gênica, π = diversidade nucleotídica.

Localidades	N	NH	S	h	π	Teste D de Tajima	Teste Fs de Fu
R. F. A. Ducke	17	09	10	0,875+/-0,057	0,0037+/- 0,0021	1,10794	-1,44395
UFAM	07	03	07	0,523+/- 0,208	0,0030+/- 0,002	0,51770	2,31363
Rebio Uatumã	10	05	09	0,755+/- 0,129	0,0036+/- 0,002	0,79029	0,85149
Barcelos	10	01	-	0,000+/- 0,000	0,0000+/- 0,000	0,00000	-
Altamira	13	02	01	0,153+/-0,126	0,0001+/-0,0002	-1,14915	-0,53714
PARNA do Viruá	09	02	01	0,222+/- 0,166	0,0002+/- 0,0003	-1,08823	-0,26348
FLONA do Amapá	07	03	02	0,666+/-0,159	0,0008+/-0,0007	0,20619	-0,23726
Acre	14	08	13	0,912+/-0,048	0,0028+/-0,0017	-1,12339	-1,99473
Santa Isabel	09	03	02	0,416+/-0,190	0,0005+/-0,0005	-0,58325	-0,53211
Tabatinga	11	03	02	0,690+/-0,086	0,0010+/-0,0008	1,66480	0,69375
Atalaia do Norte	10	03	02	0,511+/-0,164	0,0005+/-0,0005	-0,69098	-0,59381
Todos	117	31	38	0,884+/-0,017	0,0083+/-0,0043	0,66285	-3,12573

Nota: - significa que não foi possível calcular tal índice.

Os valores par a par do Φ_{ST} para os pares de populações foram calculados com o objetivo de verificar se as populações apresentam alguma estrutura genética em comparação com as outras localidades. A maioria destas comparações foi significativa ($P < 0,05$), com exceção de sete comparações: R.F. Adolpho Ducke e UFAM ($\Phi_{ST} = -0,002$), R. F. Adolpho Ducke e Rebio Uatumã ($\Phi_{ST} = -0,041$), UFAM e Rebio Uatumã ($\Phi_{ST} = -0,085$), Barcelos e PARNA do Viruá ($\Phi_{ST} = 0,012$), Santa Isabel do Rio Negro e Acre ($\Phi_{ST} = 0,077$), Santa Isabel do Rio Negro e Atalaia do Norte ($\Phi_{ST} = 0,079$) e por fim a comparação Tabatinga e Atalaia do norte ($\Phi_{ST} = 0,136$) que apresentaram valores baixos de Φ_{ST} e não significativos (Tabela 05). Todas as comparações que envolveram a localidade de Altamira foram significativas e obtiveram altos valores de Φ_{ST} , destacando-se duas comparações, Altamira e Barcelos ($\Phi_{ST} = 0,9851$) e o par Altamira e Atalaia do Norte ($\Phi_{ST} = 0,9798$). Apresentaram também valores indicativos de estruturação genética as comparações FLONA do Amapá e PARNA do Viruá ($\Phi_{ST} = 0,237$), FLONA do Amapá e Barcelos ($\Phi_{ST} = 0,321$), Acre e Atalaia do Norte ($\Phi_{ST} = 0,194$) e o par Acre e Tabatinga ($\Phi_{ST} = 0,194$).

Os resultados das comparações entre pares de populações em relação ao Φ_{ST} também foram utilizados para estimar indiretamente o número efetivo de fêmeas migrantes por geração (N_{mf}) entre as localidades amostradas de *P. bicolor* (Tabela

05). Essas comparações mostram que as populações de R.F. Adolpho Ducke, UFAM e Rebio Uatumã apresentaram altos valores de *Nemf*, o que indica que pode existir fluxo gênico entre essas localidades. O mesmo pode estar ocorrendo no par Barcelos e PARNA do Viruá, que apresentou elevado valor de migrantes por geração (*Nemf* = 40,00). Os resultados dessa análise indicaram também que a população da localidade R.F. Adolpho Ducke demonstra fluxo gênico restrito com as localidades PARNA do Viruá e FLONA do Amapá (*Nemf* = 1,0414 e *Nemf* = 1,6408 respectivamente). O mesmo resultado é evidenciado em outras comparações como PARNA do Viruá e FLONA do Amapá (*Nemf* = 1,608), Barcelos e FLONA do Amapá (*Nemf* = 1,055) e, Santa Isabel do Rio Negro e Tabatinga (*Nemf* = 1,365). Já as comparações Acre e Santa Isabel do Rio Negro, Atalaia do Norte e Santa Isabel do Rio Negro revelaram valores de *Nemf* que indicam fluxo gênico entre essas localidades, mesmo sendo separadas por mais de 1200 e 780 quilômetros de distância, respectivamente.

Através do programa MEGA 4.0 foi obtida uma árvore filogenética não enraizada baseada no método de Mínima Evolução que apresentou basicamente quatro clados representados por grupos de localidades como pode ser observado na Figura 05. A cor azul representa os indivíduos das localidades da Amazônia Central (R. F. Adolpho Ducke, UFAM, Rebio. Uatumã), a cor vermelha representa a localidade Altamira situada sobre o Escudo Brasileiro, a cor verde representa um agrupamento que inclui as localidades do Escudo das Guianas e a localidade de Barcelos, e a cor laranja representa as localidades do Oeste Amazônico (Santa Isabel do Rio Negro, Tabatinga, Atalaia do Norte e Acre).

A árvore de Evolução Mínima mostra a separação das amostras em quatro clados distintos. Um dos agrupamentos apresenta indivíduos somente da localidade Altamira, constituindo um clado monofilético. Já as localidades da Amazônia Central mostram-se em dois clados distintos, um deles apresenta representantes desta região geográfica, e outro que agrupa indivíduos da Amazônia Central e Escudo das Guianas mais a localidade de Barcelos (Clado com indivíduos de cores verdes e azuis). O quarto clado mostra as localidades do Oeste Amazônico agrupadas formando mais um clado monofilético.

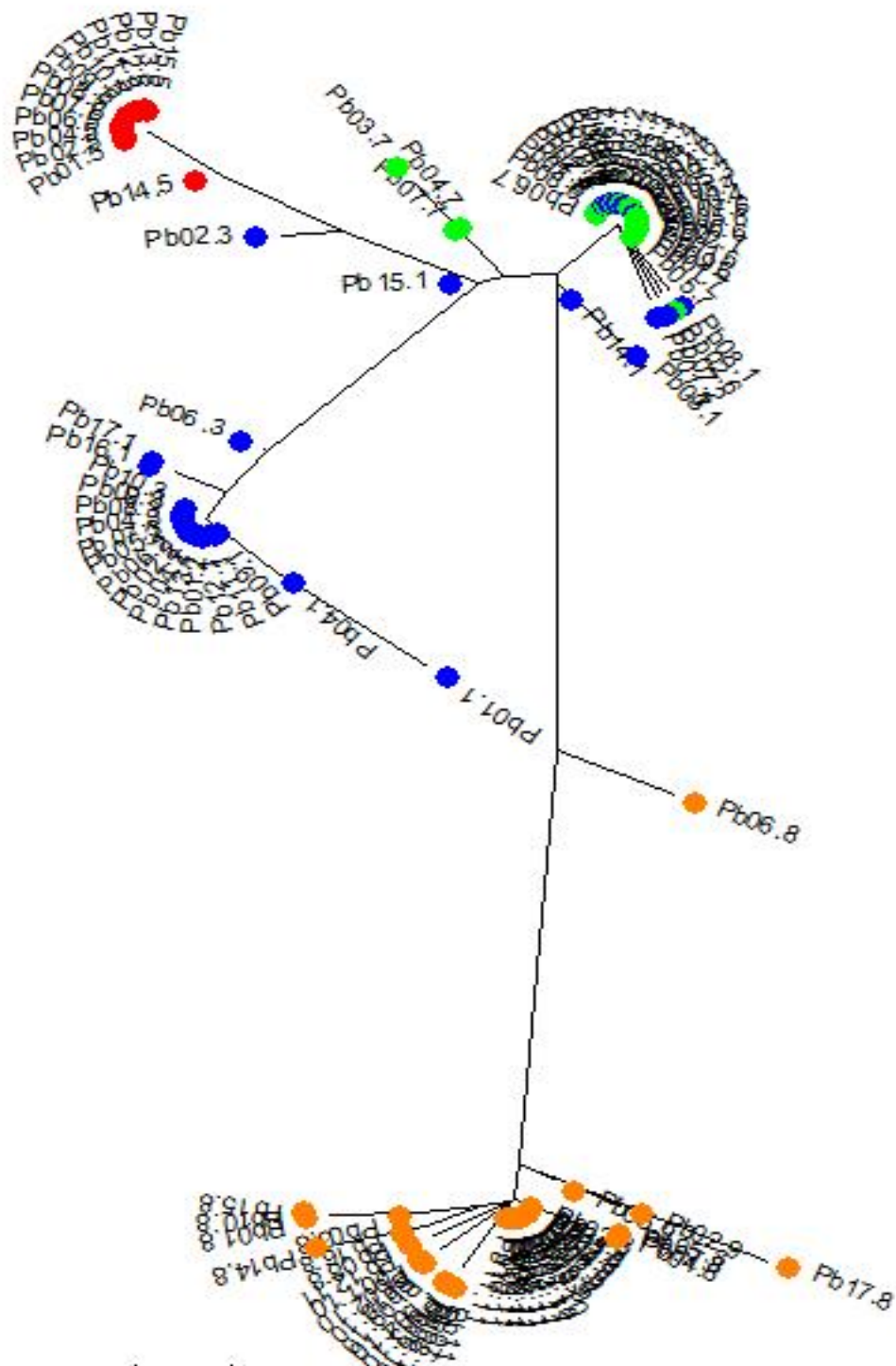


Figura 05: Árvore filogenética não enraizada com base no modelo de Mínima Evolução gerada pelo método de Kimura 2 parâmetros. Nota: as cores representam indivíduos dentro de grupos de localidades, a cor vermelha representa a localidade Altamira; a cor Azul representa as localidades R. F. Adolpho Ducke, UFAM e Rebio Uatumã; a cor verde representa as localidades Barcelos, PARNA do Viruá, e FLONA do Amapá; e a cor laranja representa as localidades Santa Isabel do Rio Negro, Tabatinga, Atalaia do Norte e Acre.

Tabela 05- Matriz mostrando os valores de Φ_{ST} das comparações entre os pares de populações de *Phyllomedusa bicolor* (abaixo da diagonal). Acima da diagonal encontram-se os números efetivos de fêmeas migrantes por geração (*N_{emf}*).

POP.	RAD (1)	UFA (2)	UAT (3)	BAR (4)	ALT (5)	VIR (6)	AMP (7)	ACR (8)	STI (9)	TAB (10)	ATA (11)
RAD (1)	-	inf	inf	0,959	0,224	1,041	1.640	0,146	0,115	0,110	0,108
UFA (2)	- 0,002	-	inf	0,214	0,096	0,253	0.418	0,116	0,064	0,066	0,058
UAT (3)	- 0,041	- 0,085	-	0,464	0,172	0,522	0.866	0,133	0,091	0,088	0,083
BAR (4)	0,42*	0,99*	0,518*	-	0,007	40,00	1.055	0,075	0,011	0,022	0,011
ALT (5)	0,690*	0,838*	0,743*	0,985*	-	0,015	0.037	0,053	0,011	0,017	0,010
VIR (6)	0,324*	0,663*	0,488*	0,012	0,969*	-	1.608	0,083	0,017	0,027	0,016
AMP (7)	0,233*	0,544*	0,366*	0,321*	0,929*	0,237*	-	0,099	0,029	0,039	0,027
ACR (8)	0,773*	0,810*	0,788*	0,868*	0,903*	0,857*	0.834*	-	5,928	2,067	4,309
STI (9)	0,812*	0,886*	0,845*	0,976*	0,978*	0,966*	0.943*	0,077	-	1,365	5,779
TAB (10)	0,818*	0,882*	0,849*	0,956*	0,966*	0,947*	0.926*	0,194*	0,268*	-	3,173
ATA (11)	0,821*	0,894*	0,856*	0,977*	0,979*	0,967*	0.947*	0,103*	0,079	0,136	-

Os números entre parênteses ao lado das abreviaturas das populações são os números atribuídos as localidades em todas as análises. * indica o nível de significância de $P < 0,05$, inf = valor de *N_{emf}* infinito.

A correlação entre a divergência genética e a distância geográfica de *P. bicolor* coletadas na Amazônia foi realizada via teste de Mantel. O resultado revelou baixa correlação significativa entre distância genética encontrada e a distância geográfica ($r = 0,26521$, $P = 0,06$). Portanto, a variação genética encontrada entre as populações de *P. bicolor* não pode ser explicada pela simples distribuição geográfica das amostras.

As análises de NCPA definiram seis níveis hierárquicos correspondentes aos cladogramas (1-7, 2-2, 2-7, 3-1, 3-2 e 4-1), o que demonstra a rejeição da hipótese nula da não associação entre distância geográfica e divergência genética (Figura 06). Os resultados gerados pela chave de inferência de Templeton (Templeton 2005) sugerem que no menor nível de agrupamento (clado 1-7), corresponde a “fluxo gênico restrito com isolamento por distância”. Já em um nível superior de agrupamento, que corresponde ao nível 2-2, sugere a ocorrência de “fluxo gênico restrito” ou “dispersão a longa distância sobre áreas geográficas não ocupadas pela espécie”, ou ainda “fluxo gênico no passado seguido de extinções em populações intermediárias”. Já os resultados para o clado 2-7 não foram conclusivos.

As análises de NCPA revelaram ainda que os níveis 3-1, 3-2 e o maior nível de agrupamento hierárquico 4-1 podem ter passado por “fluxo gênico restrito” ou “dispersão a longa distância sobre áreas geográficas não ocupadas pela espécie”, ou ainda “fluxo gênico no passado seguido de extinções em populações intermediárias” (Tabela 6). Apesar de não conclusivos quanto à identificação de um possível evento histórico demográfico nos maiores níveis de agrupamentos hierárquicos do cladograma, os resultados gerados pela NCPA fornecem informações a respeito da correlação significativa entre divergência genética e distribuição geográfica.

Tabela 06: Resultado das análises do agrupamento dos clados (NCPA) em *P. bicolor*, mostrando os valores das distâncias dos clados (Dc), distâncias dos clados agrupados (Dn) e distância dos clados interiores versus ponta (I-T). Apenas clados com permutações significantes (X2) para estrutura geográfica constam nesta tabela.

Nível agrupado	Clados inclusos	Localização	D _c	D _n	Valores X ² -P	Conclusão da chave de inferência
1-7	H31	Ponta	0.00000	181.142	0,02	Fluxo gênico restrito com isolamento por distância
	H29	Ponta	0.0000*<	150.586*<		
	H30	Ponta	9.2493*<	156.096*<		
	H20	Interior	375.234*>	360.044*>		
	I-T		370.189*>	203.675*>		
2-2	1-3	Ponta	0.0000*<	812.005*>	0,02	Fluxo gênico restrito/dispersão a longa distância sobre áreas geográficas não ocupadas pela espécie ou fluxo gênico no passado seguido de extinções em populações intermediárias
	1-5	Interior	416.126*<	450.134*<		
	I-T		416.126*>	-361.871*<		
2-7	1-7	Interior	289.116	269.392*<	0,002	Resultado Não Conclusivo
	1-14	Interior	0.0000	593.023*>		
	I-T		-	-		
3-1	2-1	Ponta	85.133*<	243.295*<	0,000	Fluxo gênico restrito/dispersão a longa distância sobre áreas geográficas não ocupadas pela espécie ou fluxo gênico no passado seguido de extinções em
	2-2	Ponta	489.509	518.016*>		
	2-3	Ponta	118.276*<	620.80*>		
	2-6	Interior	273.796	325.690		
	I-T		-37.701	-139.330		

						populações intermediárias
3-2	2-4	Ponta	432.791	613.850*>		
	2-5	Ponta	0.000*<	539.387*>	0,0002	Fluxo gênico restrito/dispersão a longa distância sobre áreas geográficas não ocupadas pela espécie ou fluxo gênico no passado seguido de extinções em populações intermediárias
	2-7	Interior	291.513	267.741*<		
	I-T		161.676	-293.985*<		
4-1	3-1	Ponta	457.201*<	569.567*<		
	3-2	Ponta	328.180*<	865.104*>	0,0000	Fluxo gênico restrito/dispersão a longa distância sobre áreas geográficas não ocupadas pela espécie ou fluxo gênico no passado seguido de extinções em populações intermediárias
	3-3	Interior	0.0000	1312.395		
	I-T		-409.370*>	633.270		

Nota: Os valores significativamente menores ou maiores para Dc, Dn e I-T (Dc e Dn) estão indicados respectivamente por < (pequeno) e > (grande) e * indica o nível de significância ($P < 0,05$). Os resultados foram interpretados utilizando a chave de inferências de Templeton (Templeton, 2005).

Para verificar as distâncias genéticas entre as localidades amostradas, foi implementado no programa MEGA 4.0 uma estimativa da divergência evolucionária sobre pares de sequências entre cada localidade (Tabela 07). Essas distâncias genéticas variaram de 0% a 1,6%, onde as maiores distâncias sempre ocorreram entre as comparações que envolveram localidades do Oeste Amazônico com as demais localidades.

A análise de variância molecular espacial (SAMOVA) foi empregada com o intuito de revelar a formação de grupos biológicos *a posteriori*. Várias análises foram

computadas variando o número de K (números de grupos testados). Assim, foi possível constatar, que o valor de *F_{ct}* (índice de diferenciação entre grupos) chega a ficar relativamente constante em uma variação genética de 83,97%. Quando testado K= 4 grupos o valor de *F_{ct}* possui um suporte mais significativo ($P < 0,001$), explicando a formação dos grupos com a seguinte configuração: grupo 1) UFAM, Reserva Florestal Adolfo Ducke e Rebio Uatumã; grupo 2) Barcelos, PARNA do Viruá e FLONA do Amapá; grupo 3) Altamira; grupo 4) Cruzeiro do Sul, Santa Isabel do Rio Negro, Tabatinga e Atalaia do Norte (Tabela 08).

Tabela 07: Estimativa da divergência evolutiva sobre pares de sequências entre as localidades. Os resultados são baseados em comparações par a par de 117 indivíduos de *P. bicolor* agrupados em suas respectivas localidades, A análise foi conduzida utilizando o método evolutivo Kimura 2-parâmetros no programa MEGA 4.0

Loc.	RAD(1)	UFA(2)	UAT(3)	BAR(4)	ALT(5)	VIR(6)	AMP(7)	ACR(8)	STI(9)	TAB(10)	ATA(11)
RAD(1)	-										
UFA(2)	0,003	-									
UAT(3)	0,004	0,003	-								
BAR(4)	0,003	0,004	0,004	-							
ALT(5)	0,007	0,007	0,007	0,006	-						
VIR(6)	0,003	0,004	0,004	0,000	0,006	-					
AMP(7)	0,003	0,004	0,004	0,001	0,005	0,001	-				
ACR(8)	0,015	0,016	0,015	0,013	0,016	0,013	0,013	-			
STI(9)	0,014	0,015	0,014	0,012	0,015	0,012	0,012	0,002	-		
TAB(10)	0,015	0,015	0,015	0,012	0,016	0,013	0,013	0,002	0,001	-	
ATA(11)	0,014	0,015	0,015	0,012	0,016	0,012	0,012	0,002	0,001	0,001	-

Tabela 08: Probabilidade posterior da formação de grupos gerada através do programa SAMOVA apresentado a porcentagem de variação entre os grupos testados na análise de estruturação estão presentes nesta tabela somente os valores de K que obtiveram as maiores variações e valores de Fct significantes (abreviações ver Tabela 02).

Números de grupos (K)	Grupos formados	Porcentagem da variação	Valor de Fct	Teste de significância
2 grupos	1 (ACR, STI, TAB, ATA)			
	2 (RAD, UFA, UAT, BAR, ALT, VIR, AMP)	76,58	0,765*	0,002+- 0,00164
3 grupos	1 (ACR, STI, ATA, TAB)			
	2 (RAD, UFA, UAT, BAR, VIR, AMP)	81,36	0,813*	0,00098+-
	3 (ALT)			0,00098
4 grupos	1 (RAD, UAT, UFA)			
	2 (BAR, VIR, AMP)	83,97	0,839*	0,00000+-
	3 (ALT)			0,00000
	4 (ACR, STI, TAB, ATA)			
5 grupos	1 (ALT)			
	2 (RAD, UFA, UAT)	83,46	0,834*	0,00000+-
	3 (BAR, VIR, AMP)			0,00000
	4 (ACR)			
	5 (STI, TAB, ATA)			

* indica o nível de significância de $P < 0,05$

Outra análise de agrupamento de populações ou grupo de populações *a posteriori* foi realizada pela Análise Bayesiana de Estrutura de População implementada pelo programa BAPS 5.1 (Corander et al. 2007). Verificamos que o melhor valor de probabilidade posterior para a formação de grupos corresponde a cinco agrupamentos (*Clusters*) como observado na tabela 9. Nesses agrupamentos foi possível observar que as localidades Acre, Reserva Florestal Adolpho Ducke e Rebio Uatumã apresentaram representantes em mais de um *cluster*. O *cluster* 4 foi o que agrupou um maior número de localidades sendo composto pela Reserva Florestal Adolpho Ducke, UFAM, Barcelos, PARNA do Viruá e FLONA do Amapá. A localidade Altamira aparece na análise se agrupando com um único indivíduo da Rebio Uatumã no *cluster* 5.

Tabela 09: Agrupamentos de populações suportados pelo programa BAPS 5.1; este arranjo de agrupamentos populacionais é apoiado por uma probabilidade posterior de 0,918 (abreviações ver Tabela 02).

Número de <i>Clusters</i>	Localidades agrupadas
<i>Cluster 1</i>	ACR
<i>Cluster 2</i>	STI, TAB, ATA, ACR
<i>Cluster 3</i>	RAD, UFA, UAT
<i>Cluster 4</i>	RAD, UFA, BAR, VIR, AMP
<i>Cluster 5</i>	UAT, ALT

A Figura 07 representa um gráfico gerado pelo programa BAPS, onde cada *cluster* é identificado por barras coloridas. Observa-se que as populações do oeste da Amazônia brasileira se agruparam em um único *cluster* e são representados pela cor verde, com apenas um indivíduo apresentando a cor vermelha. As localidades Barcelos, PARNA do Viruá e FLONA do Amapá apresentam somente a cor amarela, o que indica que estes grupos possuem uma maior homogeneidade genética entre si. Já a localidade de Altamira mostra-se como um único grupo indicado pela cor rosa, e esta mesma cor aparece em um único indivíduo da localidade Rebio Uatumã o que indica compartilhamento de haplótipos.

A localidade Reserva Florestal Adolpho Ducke apresenta na Figura 07, em sua maioria, indivíduos de cor amarela com alguns indivíduos de cor azul, diferentemente do que aparece na localidade UFAM onde a maioria dos indivíduos apresenta cor azul. O mesmo ocorre com a localidade Rebio Uatumã, porém esta, como já citado, apresenta também um único indivíduo com a cor rosa. Nessas três localidades não foi encontrado muita homogeneidade, o que é evidente pelas diferentes cores que elas apresentam. Porém, a cor azul só ocorre nessas três localidades o que pode ser indicativo do agrupamento dessas populações (ver *cluster 3* na tabela 09).

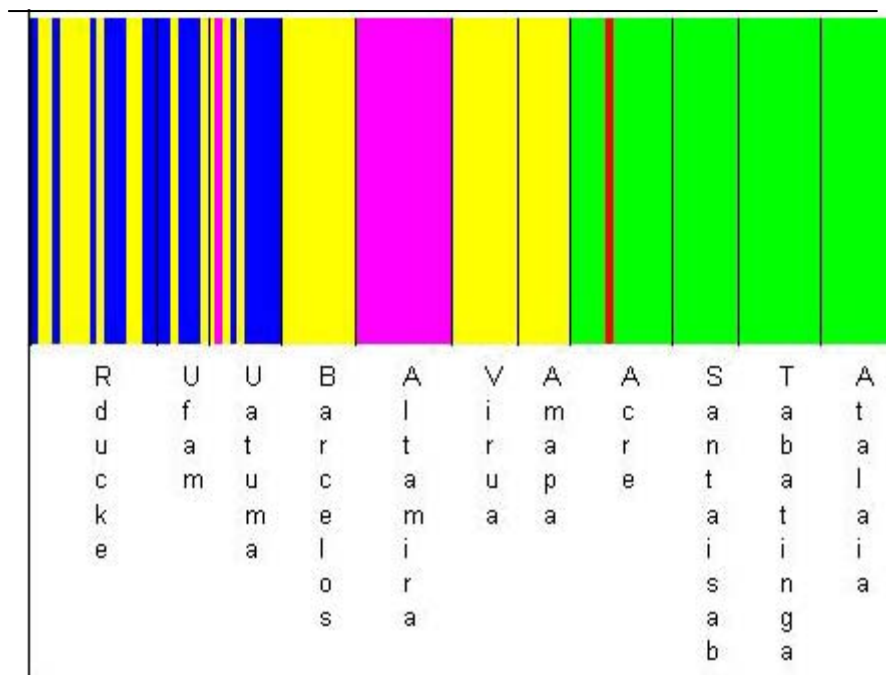


Figura 7- Gráfico em barras gerado pela análise implementada no Programa BAPS (*Bayesian Analysis of Population Structure* versão 5.1) a qual estima a probabilidade posterior da formação de grupos que são representados pelas cores, mostrando um total de 5 grupos.

6. Discussão

6.1 Diversidade genética em *Phyllomedusa bicolor*

Os valores de diversidade gênica apresentados pelas localidades estudadas variaram muito, chegando a valores altos como os de 0,91 no Acre, a praticamente inexistente como em Barcelos, onde todos os indivíduos apresentaram o mesmo haplótipo. As duas amostras populacionais citadas acima apresentaram tamanhos amostrais de 14 e 10 indivíduos respectivamente. Entretanto, no Acre a amostragem foi realizada em três diferentes sítios reprodutivos, sendo dois no município de Cruzeiro do Sul e um no município de Rio Branco. Já na localidade de Barcelos, a coleta foi realizada em apenas um sítio reprodutivo. Provavelmente o que estamos observando, em relação a esse dois exemplos, é que a variação da diversidade gênica, entre as duas localidades, está sendo influenciada pelo método de amostragem em sítios reprodutivos diferentes em uma mesma localidade.

Quando observamos os valores de diversidade gênica das localidades Santa Isabel do Rio Negro e FLONA do Amapá, as quais tiveram um padrão de coleta semelhante ao modelo de Barcelos verificamos que a diversidade gênica apresenta-se um pouco mais elevada (Tabela 04). A diversidade gênica verificada para a localidade Barcelos possivelmente tem a ver com: 1) o tipo de amostragem em um único sítio reprodutivo, 2) Os indivíduos coletados nessa localidade tem um maior relacionamento familiar do que os exemplares de Santa Isabel do Rio Negro e FLONA do Amapá (essas duas localidades também foram amostradas em apenas um sítio reprodutivo), porém com uma menor variabilidade genética do que todas as outras localidades estudadas.

Em sete das onze localidades verificamos valores elevados de diversidade gênica, porém quando observamos os valores de diversidade nucleotídica observamos que somente quatro localidades apresentaram uma maior variação em suas composições nucleotídicas para o DNAm: Reserva Florestal Adolpho Ducke, Rebio Uatumã, UFAM e Acre (Tabela 03).

Dentre os indivíduos coletados na Reserva Florestal Adolpho Ducke foram observados 9 haplótipos, sendo que o haplótipo H2 desta localidade possui maior distribuição geográfica e maior número de ocorrências. Tais características estão de acordo com o critério de origem baseado na frequência descrito por Templeton

(1998) e provavelmente seria o haplótipo ancestral dos indivíduos de *Phyllomedusa bicolor*. Em segundo lugar em números de haplótipos está à localidade Acre com um total de 8, já a localidade Rebio Uatumã possui cinco haplótipos, esse conjunto de haplótipos das três localidades acima citadas, juntos correspondem a 70% do total de haplótipos encontrados nesse estudo, que foi um total de 31.

Funk et al. (2007) encontraram um grande número de haplótipos (para os segmentos mitocondriais regiões 12S, 16S e o gene do RNA transportador da valina) para a espécie *Engystomops petersi*. Foram observados 44 haplótipos em 65 amostras coletadas em 22 sítios de coleta distribuídos no oeste da Amazônia. Já na bacia do rio Juruá, Lougheed et al. (1999) em seu trabalho com a espécie *Allobates femoralis*, verificaram a existência de 19 haplótipos (para o segmento citocromo b) em 25 amostras. Comparando as amostragens e os números de haplótipos encontrados nesses trabalhos com o presente estudo, verificamos que nossa amostragem apresentou um número menor de haplótipos devido a características dos fragmentos seqüenciados, que não apresentaram muita variação entre as localidades.

Em nossas análises, Barcelos foi a localidade que teve o menor número de haplótipos; os 10 indivíduos coletados nesta localidade estão representados por apenas um haplótipo. Possivelmente esta localidade seria uma população recente, e que o tempo desde o surgimento até o presente não foi suficiente para haver o aparecimento de novos haplótipos. Novamente vemos o efeito da amostragem ou provavelmente a relação de parentesco entre esses indivíduos.

Quando comparamos a quantidade de sítios polimórficos, verificamos que todas as localidades juntas apresentam um total de 38 em 1037 sítios, com a localidade Acre apresentando 13 sítios polimórficos seguida pela localidade Reserva Florestal Adolpho Ducke com 10, e a localidade Rebio Uatumã, com 9. Novamente, verificamos a existência de altos valores de diversidade para essas três localidades. Funk et al. (2007) verificaram a existência de 23 sítios polimórficos para um total de 2380 sítios (obtidos a partir das regiões 12S, 16S e o RNA transportador da valina). Já Lougheed et al. (1999) utilizando o gene citocromo b (305 pares de bases) também do DNAm, encontraram um total de 61 sítios polimórficos.

Se levarmos em conta as características genéticas das regiões estudadas no presente estudo, encontramos uma explicação para a quantidade de sítios

polimórficos e o número de haplótipos encontrados nesse trabalho. A região 16S apresenta-se bastante conservada, mas apresenta certas regiões variáveis, que estão relacionadas com regiões de *loops* na estrutura secundária desta molécula, que possibilita o aparecimento de mutações nesses locais, por isso foi escolhida como marcador molecular que representa o “*barcoding* dos anfíbios” (Vences et al. 2005). Já a Região Controle do DNAm possui maior variação nucleotídica, pois as taxas de evolução dessa região são de duas a cinco vezes mais altas do que em genes mitocondriais codificantes de proteína (Greenberg et al., 1983), porém o sequenciamento dessa região foi realizado utilizando inicialmente *primers* desenvolvidos por Goebel et al. (1999) (ControllP-H) e depois de obtidas as primeiras sequências foi possível desenvolver *primers* específicos para *P. bicolor*. Como inicialmente foram usadas sequências obtidas com o auxílio dos *primers* desenvolvidos por Goebel et al. (1999), os *primers* desenvolvidos para o nosso trabalho e usados nos sequenciamentos são de uma região central e conservada da Região Controle (Goebel et al. 1999), o que provavelmente influenciou na quantidade reduzida de sítios polimórficos encontrados nas populações de *P. bicolor*.

Os dados de diversidade mostram-se bastante heterogêneos variando muito os níveis de variabilidade para cada localidade. Isso provavelmente deve estar relacionado com o padrão de amostragem entre as localidades: quando amostramos em mais de um ponto de coleta os índices aumentam, porém quando amostramos em um único sítio reprodutivo os valores diminuem. Os valores de diversidade mostram-se reduzidos provavelmente devido a endogamia, indivíduos que vivem próximos podem ter relação de parentesco mais próxima e com isso exibem uma menor variabilidade genética.

6.2 Análise da estrutura genética populacional e fluxo gênico

A análise de variância molecular (AMOVA) revelou que a maior parte da variação genética encontrada (81,66%) está distribuída entre as populações. As populações de *P. bicolor* que nessa análise foram delimitadas *a priori* pelas localidades amostradas estão estruturadas, o que pode ser evidenciado pelo índice de diferenciação gerado pela análise $\Phi_{ST} = 0,8166$ com elevada significância ($P <$

0,001). Essa análise nos informa que há algum nível de estruturação nas populações amostradas.

As comparações par a par do Φ_{ST} entre cada localidade nos mostram que a maioria das comparações apresentou valores elevados e sensivelmente significantes, valores esses considerados de forte estruturação, acima de 0,25 (Wright 1931). Os pares Altamira e Barcelos e, Atalaia do Norte e Altamira foram as comparações que obtiveram os maiores valores de índices de diferenciação, portanto se apresentam fortemente estruturadas entre si, ou seja, estão diferenciadas geneticamente umas das outras possivelmente devido a distância entre essas localidades.

As comparações R. F. Adolpho Ducke vs. UFAM e R. F. Ducke vs. Rebio Uatumã não apresentaram valores de Φ_{ST} significativos, além disso, esses valores foram baixos não indicando nenhuma estruturação entre essas localidades da Amazônia Central. Quando observados os valores do número de migrantes por geração entre esses pares de comparações verificamos grande ocorrência de fluxo gênico entre essas três localidades as quais não podem ser consideradas geneticamente diferenciadas. O mesmo padrão de similaridade genética parece ocorrer também entre os pares Barcelos e PARNA do Viruá, Santa Isabel do Rio Negro e Atalaia do Norte e, Santa Isabel do Rio Negro e Acre que estão separadas por mais de 1200 quilômetros de distância e parecem não estar diferenciados geneticamente.

Quando examinamos o par Barcelos e PARNA do Viruá verificamos a presença de fluxo gênico entre essas duas localidades apesar de separadas por mais de 360 quilômetros. Este resultado revela intenso fluxo gênico e ausência de estruturação, possivelmente representando uma menor diferenciação entre Barcelos e PARNA do Viruá. Ainda nessas análises verificamos que a localidade R. F. Adolpho Ducke em relação às localidades PARNA do Viruá e FLONA do Amapá apresentam valores de $Nemf$ que indicam fluxo gênico restrito, sugerindo que possivelmente em algum momento de suas respectivas histórias evolutivas as populações trocaram genes entre si. Um padrão similar é encontrado entre o par PARNA do Viruá e FLONA do Amapá e também no par Santa Isabel do Rio Negro e Tabatinga.

No presente estudo, os resultados sugerem que as localidades da Amazônia Central (R.F. Adolpho Ducke, UFAM, Rebio Uatumã), Escudo das Guianas (PARNA do Viruá e FLONA do Amapá) mais a localidade de Barcelos estão mais relacionadas entre si, de modo que entre essas localidades encontramos os menores índices de diferenciação. Quando comparados aos valores do índice de diferenciação das localidades do Oeste Amazônico (Santa Isabel do Rio Negro, Tabatinga, Atalaia do Norte e Acre), estas se apresentam fortemente diferenciadas em relação as localidades da Amazônia Central e Escudo das Guianas e a localidade de Barcelos. Ainda a localidade que está no Escudo Brasileiro, Altamira, demonstra-se diferenciada de todas as outras localidades.

Os resultados gerados pela SAMOVA e BAPS corroboram a formação dos grupos descritos acima. No resultado gerado pela SAMOVA, o valor de K com o maior F_{ct} e maior variação entre grupos foi K=4, e curiosamente os 4 grupos encontrados na análise se configuram como: grupo 1) localidades da Amazônia Central; grupo 2) localidades do Escudo das Guianas mais Barcelos; grupo 3) representado pela localidade do Escudo Brasileiro (Altamira) e o grupo 4) representado pelas localidades do Oeste Amazônico.

Os resultados gerados pelo BAPS nos contam uma história semelhante com um número de cinco *clusters*. Neste caso, novamente foi observado uma configuração parecida com os outros resultados descritos acima. No *cluster* 1 encontramos um único indivíduo do Acre, no *cluster* 2 encontramos todas as localidades do Oeste Amazônico, no *cluster* 3 estão agrupadas as localidades da Amazônia Central, no *cluster* 4 encontramos uma mescla de Amazônia Central e Escudo das Guianas mais Barcelos; já no *cluster* 5 encontramos um único indivíduo da localidade Rebio Uatumã agrupando-se com a localidade do Escudo Brasileiro (Altamira).

Verificamos que na análise gerada pelo BAPS há um compartilhamento de haplótipos entre Amazônia Central e Escudo das Guianas e um haplótipo compartilhado entre a localidade Rebio Uatumã e a localidade do Escudo Brasileiro. Entretanto a configuração de grupos apresentada por essa análise não difere daquilo que foi evidenciado em outras análises no presente estudo. Aparentemente, as 11 localidades amostradas se agrupam em quatro grupos distintos na Amazônia brasileira constituindo quatro unidades geneticamente diferenciadas.

Os padrões demográficos históricos envolvidos na dinâmica populacional do kambô foram identificados e interpretados pela NCPA. No presente estudo foram encontrados 6 clados (1-7, 2-2, 2-7, 3-1, 3-2 e 4-1) onde há rejeição da hipótese nula da não correlação entre variação genética e distribuição geográfica, apesar da fraca correlação encontrada pelo teste de Mantel.

Para o clado 1-7, que agrupa localidades do Oeste Amazônico, o NCPA indicou “fluxo gênico restrito com isolamento por distância”. Neste clado está presente o haplótipo H20 que ocorre nas localidades de Acre, Santa Isabel do Rio Negro, Tabatinga e Atalaia do Norte, constituindo o segundo haplótipo mais distribuído geograficamente e que possui a segunda maior frequência. Portanto, caracterizando provavelmente o haplótipo ancestral para essa região da Amazônia. Já o haplótipo H2 localizado no clado 2-2, o qual agrupa as localidades do Escudo das Guianas juntamente com Barcelos e as localidades da Amazônia Central, é o que possui a maior distribuição geográfica e maior frequência na amostragem correspondendo ao haplótipo mais antigo da espécie *P. bicolor*, tendo em vista que a extensão geográfica de um haplótipo está diretamente relacionada com sua idade (Templeton 1998).

A existência de haplótipos amplamente espalhados geograficamente faz com que esses clados possuam atributos robustos para aceitação de um padrão demográfico de fluxo gênico restrito via isolamento por distância, tendo em vista que quando uma mutação ocorre e cria um novo haplótipo, este novo haplótipo reside inicialmente dentro da distribuição geográfica de seu haplótipo ancestral. Entretanto, se há fluxo gênico restrito, resultante do movimento limitado de indivíduos ou por qualquer fenômeno de vicariância, este haplótipo novo ficará por mais tempo restrito a apenas uma área geográfica (Templeton 1998).

Quando analisamos o clado 2-2, a NCPA indicou esquema de amostragem inadequado para diferenciar entre “fluxo gênico restrito”, “dispersão a longa distância sobre áreas geográficas intermediárias não ocupadas pela espécie” e “fluxo gênico no passado seguido de extinções nas populações intermediárias”. Porém, neste clado está agrupado o haplótipo ancestral de *P. bicolor*, e essa característica é uma forte evidência de que o padrão mais aceito é o mesmo indicado para o clado 1-7.

O clado 2-7 apresentou, segundo a inferência de Templeton (2005), “resultados não conclusivos”, isso não é uma falha da análise, mas sim uma

vantagem, pois a habilidade da chave de inferência de identificar tal resultado mostra a deficiência de nossa amostragem. A chave de inferência também incorpora os tipos de padrões que podem surgir em uma amostragem inadequada, conduzindo assim a nenhuma inferência biológica definitiva (Templeton 1998).

Nos Clados 3-1 e 3-2, a inferência também indicou esquema de amostragem inadequado para diferenciar entre “fluxo gênico restrito”, “dispersão a longa distância sobre áreas geográficas intermediárias não ocupadas pela espécie” e “fluxo gênico no passado seguido de extinções nas populações intermediárias”. Entretanto esses clados apresentam-se conectados por um único haplótipo. O restante dos passos mutacionais ocorrem ligando os haplótipos intermediários (não amostrados simbolizados pelos pequenos círculos entre os passos mutacionais, ver Figura 06), ou seja, há uma falta de amostragem entre regiões geográficas intermediárias para os dois clados 3-1 e 3-2. Segundo Templeton (1998), quando um cladograma mostra essa configuração onde clados de altos níveis hierárquicos apresentam entre si muitos haplótipos intermediários (não amostrados), o padrão de diferenciação é devido a um isolamento por distância.

Os resultados gerados pela NCPA indicam que em nossa amostragem há sim clados que rejeitam a hipótese nula da não associação entre a distância geográfica e a divergência genética, porém o esquema de amostragem foi inadequado para decidir, com exatidão, o melhor modelo para explicar a diferenciação encontrada. Apesar disso, foi possível verificar que em todas as inferências há sempre uma indicação para “fluxo gênico restrito”, possivelmente provocado por isolamento por distância. Em nossa amostragem possuímos pontos de coleta que variam de 40 a 2500 km de distância entre si e considerando que os anuros geralmente são animais com pouca capacidade de se deslocar por grandes distâncias, concluímos que provavelmente o modelo de fluxo gênico restrito devido a um isolamento por distância se aplica aos resultados obtidos.

A Figura 05 e a Tabela 07 corroboram com as análises descritas acima onde a configuração de 4 grupos é apresentada na forma de árvore filogenética de Mínima Evolução. Os resultados das distâncias genéticas nos mostram que há uma maior diferenciação entre pares de localidades da Amazônia Central, Escudo das Guianas e Escudo Brasileiro em relação às localidades do Oeste Amazônico, onde encontramos os maiores valores de distância genética. Provavelmente, o que

estamos vendo em nossos resultados, segue a mesma explicação da interpretação da NCPA onde o padrão mais aceito é uma diferenciação regida por um isolamento por distância. Um resultado parecido foi encontrado por Hrbek et al. (2007) que observaram que para a espécie *Arapaima gigas* um pequeno efeito de isolamento por distância é observado através dos dados de microssatélites, mas não através dos dados de DNAm.

Portanto, nossos resultados indicam que possivelmente as populações de *P. bicolor* amostradas para este estudo apresentam um padrão de diferenciação mediado por um isolamento por distância tendo em vista as grandes distâncias geográficas encontradas entre as localidades. Entretanto, novas coletas em novas localidades e em pontos intermediários devem ser realizadas para assim nos fornecer informações mais precisas sobre este padrão de diferenciação. O uso de outros marcadores moleculares (como marcadores nucleares) também podem nos fornecer novas informações que contribuirão para a confirmação de nossos resultados.

7. Conclusão

A espécie *Phyllomedusa bicolor* apresenta níveis de variabilidade genética relativamente heterogêneos em toda amostragem, variando desde níveis muito baixos a níveis elevados de diversidade, os quais nos indicam que há alguma relação entre a quantidade de sítios de amostragem e os valores dos índices de diversidade encontrados. Quando a amostragem foi realizada em apenas um sítio reprodutivo, a endogamia diminui os índices de diversidade; porém, quando a amostragem é feita em mais de um sítio, esse efeito é diminuído contribuindo para o aumento da variabilidade genética.

Em nossa amostragem foi possível verificar a existência de 4 unidades geneticamente diferenciadas sendo constituídas por: 1) Amazônia Central, 2) Escudo das Guianas mais Barcelos, 3) Escudo Brasileiro e 4) Oeste Amazônico. Verificamos uma maior relação entre os grupos Amazônia central, Escudo das Guianas e Escudo Brasileiro, pois esses apresentaram baixa diferenciação genética entre si quando contrastados com o grupo do Oeste amazônico, onde a diferenciação em relação a todos os outros grupos foi mais acentuada.

A associação entre distância genética e distância geográfica não foi evidente em toda a nossa amostragem. Entretanto, o padrão que melhor se encaixa para explicar a diferenciação genética encontrada é o isolamento por distância. Porém, nós não descartamos a possibilidade de atuação de eventos históricos-demográficos que moldaram a distribuição da variabilidade genética encontrada na espécie *P. bicolor*.

Novos estudos genéticos com outros marcadores moleculares, uma amostragem mais robusta e ainda dados de modelagem de nicho ecológico poderão nos ajudar a explicar melhor quais eventos atuaram na variabilidade genética dentro da espécie em questão, e assim fornecer informações mais precisas sobre a história evolutiva desta espécie de anuro amazônico.

8. Referências

Ananias, F. 2002, Análise citogenética e do DNA mitocondrial de populações de *Hyla semiguttata* (Anura, Hylidae) e espécies relacionadas, Universidade Federal de Campinas, Instituto de Biologia, *Tese de doutorado*, São Paulo-Brasil (s.n.).

Austin J. D., Loughheed S. C., Tanner K., Chek A. A., Bogart J. P. And Boag P. T. 2002. A molecular perspective on the evolutionary affinities of an enigmatic neotropical frog, *Allophryne ruthveni*, *Zoological Journal of the Linnean Society*, 134, 335–346.

Avise, J.C.; Neigel, J.E.; Arnold, J. 1984. Demographic influences on mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations. *J. Mol. Evol.*, (20): 99-105.

Avise, J.C.; Helfman, G.S.; Saunders, N.C.; Stanton, L.H. 1986. Mitochondrial DNA differentiation in north atlantic eels: Population genetic consequences of an unusual life history pattern. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, (83): 4350-4354.

Avise, J.C. 2000. Phylogeography: The history and formation of species. Cambridge, M. A: *Harvard University Press*.

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

Bert, T. M., Seyoum, S., Tringali, M. D. And Mcmillen-Jackson, A. 2002, Methodologies For Conservation Assessments Of The Genetic Biodiversity Of Aquatic Macro-Organisms, *Braz. J. Biol.*, 62(3): 387-408,

Brand G. D., Roberto J. S., Leite A., Silva L. P., Albuquerque S., Prates M. V., Azevedo R. B., Carregaro V., Silva J.S., Sá V. C. L., Brandão R. A and Bloch, Jr C. 2002. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta* Anti-

Trypanosoma Cruzi Activity Without Cytotoxicity To Mammalian Cells, *The Journal Of Biological Chemistry* 277, 51, pp. 49332–49340,

Brown, W.M.; Prager, E.M.; Wang, A.; Wilson, A.C. 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: Tempo and mode of evolution. *J. Mol. Evol.*, (18) 225-239.

Brown, W.M. 1985. The mitochondrial genome of animals, in *Molecular Evolutionary Genetics* (ed. R.J. MacIntyre), Plenum Press, New York, pp. 95-130.

Caramaschi U. e Cruz C. A. G., 2002 *Phyllomedusa*: posição taxonômica, hábitos e biologia (Amphibia, Anura, Hylidae), *Phyllomedusa* 1, 5-10.

Corander J, Waldmann P, Sillanpaa M.J., 2003 Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. *Genetics*, 163, 367-374.

Corander J, Waldmann P., Marttinen P. Sillanpaa M.J., 2007 BAPS 2: enhanced possibilities for the analysis of genetic population structure. *Bioinformatics* 20(15)

Chen T., Gagliardo R., Walker B., Zhoua M., Shaw C. 2005. Partial structure of the phylloxin gene from the giant monkey frog, *Phyllomedusa bicolor*. Parallel cloning of precursor cDNA and genomic DNA from lyophilized skin secretion *Peptides* 26 2624–2628

Clement, M.; Posada, D.; Crandall, K.A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 10: 1657 – 1660

Daly J. W., Janet Caceres, Roger W. Moni, Fabian Gusovsky, Malcolm Moos, Jr., Kenneth B. Seamon, Katharine Milton, And Charles W. Myers, 1992, Frog secretions and hunting magic in the upper Amazon: Identification of a peptide that interacts with an adenosine receptor, *Proc. Nat. Acad. Sci. Pharmacology, USA* Vol. 89, pp. 10960-10963,

Dupanloup I., Schneide S. R., and Excoffier L., 2002 A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations, *Molecular Ecology* (2002) 11, 2571-2581

Erspamer V., Melchiorri P., Falconieri-Erspamer G., Negri L., Corsi R., Severini C., Barrat D., Simmacot M., And Kreil G., 1989, Deltorphins: A family of naturally occurring peptides with high affinity and selectivity for 6 opioid binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Neurobiology* Vol. 86, pp. 5188-5192.

Excoffier, L.; Smouse, P.E.; Quattro, J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial 22 DNA restriction data. *Genetics*, 131, 479-491. 23.

Excoffier L., Laval G., Schneider S., 2005 Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinf. Online*, 1, 47-50.

Faivovich, J., C.F.B. Haddad, P.C.A. Garcia, D.R. Frost, J.A. Campbell, and W.C. Wheeler. 2005. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: a phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 294: 1–240.

Feitas R., Amaral M. J., Comportamento territorial em *Phyllomedusa bicolor*, *Phyllomedusa tarsius* e *Phyllomedusa tomopterna* (Anura: Hylidae), In: Cintra R., 2004. *História natural, ecologia e conservação de algumas espécies de plantas e animais da Amazônia* – Manaus, EDUA/INPA/FAPEAM, p. 215 – 217

Frost, D. R., 2008. *Amphibian Species of the World: an Online Reference*. Version 5.2 (15 July, 2008). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php>. American Museum of Natural History, New York, USA.

Frost D. R., Grant T., Julia N., Faivovich, Raoul H., Bain, A. Hass, Célio F.B., Haddad, De Sa R. O., Channing A., Wilkinson M., Stephen C. Donnellan, C. J. R., Campbell J. A., Blotto B. L., Moler P., Drewes R. C., Nussbaum R. A., Lynch J. D.,

Green D. M., And Wheeler W.C., 2006, The Amphibian Tree Of Life, *Bulletin Of The American Museum Of Natural History*, Central Park West At 79th Street, New York, NY 10024 Number 297, 370 pp., 71 figures, 5 tables, 7 appendices.

Fu, Y.X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147: 915-925.

Funk W. C., Caldwell J. P., Peden C. E., Padia, J. M. I., De la Riva I., Cannatella D. C. 2007 Tests of biogeographic hypotheses for diversification in the Amazonian forest frog, *Physalaemus petersi* *Mol. Phylogenet. Evol.*, doi:10.1016

Funk, W. C. Donnelly M. A., Lips K. R. 2005 Alternative views of amphibian toe-clipping *Nature* vol. 443 p. 193

Goebel A. M., Donnelly J. M., and Atz M. E. 1999. PCR Primers and Amplification methods for 12S Ribosomal DNA, the Control Region, Cytochrome Oxidase I, and Cytochrome *b* in Bufonids and Other Frogs, and an Overview of PCR Primers which Have Amplified DNA in Amphibians Successfully *Molecular Phylogenetics and Evolution* Vol. 11, No. 1, February, pp. 163–199,

Gordo, M, G. Knell, D. E. R. Gonzáles. 2005. Amphibians and reptiles. Pages 191-196 in C. Vriesendorp, L. Rivera Chávez, L. Calixto, P. Fasabi, M. Vela, J.I. Rojas M., N. Pitman (eds.), Perú: Matsés. *Rapid Biological Inventories Report 16*. Chicago, Illinois : The Field Museum.

Greenberg, B.D.; Newbold, J.E.; Sugino, A. 1983. Intra-specific nucleotide sequence variability surrounding the origin of replication in human mitochondrial DNA. *Gene*, 21: 33-49.

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

Hrbek, T., Crossa, M. and Farias, I. P. 2007. Conservation strategies for *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) and the Amazonian várzea ecosystem. *Braz. J. Biol.*, 67(4, Suppl.): 909-917

Jehle R., Gasser H., Pfunder M., Amézquita A., Lima A. P. and Hödl W. 2008 Ten polymorphic microsatellite loci for *Allobates femoralis*, an Amazonian dendrobatid frog *Molecular Ecology Resources* in press.

Jobb G., Haeseler A., Strimmer K., 2004 TREEFINDER: a powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. *BMC Evolutionary Biology*, 4, 1-9.

Kimura, M. 1968. Genetic variability maintained in a finite population due to mutational production of neutral and nearly neutral isoalleles. *Genetical Research*, 11, 247- 269.

Kimura, M. 1969. The number of heterozygous nucleotides sites maintained in a finite population due to the steady flux of mutations. *Genetics* 61: 893-903.

Kimura, M. 1983. *The neutral theory of molecular evolution* Cambridge University Press, Cambridge, England.

Lescure, J. & C. Marty, 2000. *Atlas des Amphibiens de Guyane*. 100 - 111 p., ca. 100.

Li, W-H. 1997. *Molecular Evolution*. Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland. 284p.

Lima E. C., Labate, B. C., 2007 “Remédio da Ciência” e “Remédio da Alma”: os usos da secreção do kambô (*Phyllomedusa bicolor*) nas cidades, *Campos* 8(1):71-90

Lima, A. P., W. E. Magnusson, M. Menin, L. K. Erdtmann, D. J. Rodrigues, C. Keller, W. Hold, 2006. *Guia de sapos da Reserva Adolpho Ducke, Amazônia Central = Guide to the frogs of Reserva Adolpho Ducke, Central Amazonia*, 1- 168, Áttema Design Editorial, Manaus.

Lougheed, S. C., Gascon, C. Jones, D. A., Bogart, J. P., Boag, P. T., 1999 Ridges and rivers: a test of competing hypotheses of Amazonian diversification using a dart-poison frog (*Epipedobates femoralis*). *Proc R. Soc. Lond B*. 266, 1829-1835

Lougheed S. C, Austin J. D, Bogart J. P, Boag P. T and Chek A. A., 2006. Multi-character perspectives on the evolution of intraspecific differentiation in a neotropical hylid frog, *Evolutionary Biology*, 6:23

Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27:209-220.

McCarthy, M. A. & Parris, K. M. 2004. Clarifying the effect of toe clipping on frogs with Bayesian statistics. *Journal of Applied Ecology* 41: 780-786.

Meyer, A. 1993. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. *Biochemistry and molecular biology of fishes*. 2: 1-38

Neckel-Oliveira, S and Wachlevski, M., 2004, Predation on the Arboreal Eggs of Three Species of *Phyllomedusa* in central Amazônia, *Journal of Herpetology*, 38 (2): 244-248.

Negri L., Erspamer G. F., Severinit C., Potenza R. L., *, Melchiorri P., And Erspamer V. 1992. Dermorphin-related peptides from the skin of *Phyllomedusa bicolor* and their amidated analogs activate two μ opioid receptor subtypes that modulate antinociception and catalepsy in the rat, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Pharmacology*, Vol. 89, pp. 7203-7207

Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York

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

Panchal M. and Beaumont M. A., 2007 The Automation and Evaluation of Nested Clade Phylogeographic Analysis *Evolution* 61-6: 1466–1480

Posada, D.; Crandall, K.A.; Templeton, A.R. 2000. GeoDis: A program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Molecular Ecology* 9, 487-488.

Pierre T. N., Aurelia A. Seon, Mohamed Amiche and Pierre Nicolas 2000. Phylloxin, a novel peptide antibiotic of the dermaseptin family of antimicrobial/opioid peptide precursors, *Eur. J. Biochem.* 267, 370 – 378.

Ray, D. A. & L. D. Densmore. 2002. The crocodylian mitochondrial control region: General Structure, conserved sequences and evolutionary implications. *Journal of Experimental Zoology (Molecular Development and Evolution)*. 294(4):334-345

Richter K., Egger R. Negrit L., Corsit R., Severinit C., And Kreil G. 1990. cDNAs encoding [D-Ala²] deltorphin precursors from skin of *Phyllomedusa bicolor* also contain genetic information for three dermorphin-related opioid peptides Proc. Natl. Acad. Sci. USA *Neurobiology* Vol. 87, pp. 4836-4839.

Rodrigues L. O., Duellman W. E., 1994 Guide to the Frogs of the Iquitos Region, Amazonian Peru University of Kansas Publications, Natural History Museum No. 22

Rozas J., J. C. Sánchez – Del Barrio, X. Messeger, R. Rozas 2003. DNA polymorphism analyses by the coalescence and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496 – 2497.

Sambrook J; Fritsch E. F.; Maniatis, T. 1989 Molecular Cloning: a Laboratory manual. 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Schwartz, C. A.; Castro, M. de S.; Pires Junior, O. R.; Maciel, N. M.; Ferroni, E. N. & Sebben, A.; Princípios bioativos da pele de anfíbios: panorama atual e perspectivas,

2007 em: Nascimento, L. B. &Oliveira, M. E.; *Herpetologia do Brasil II*, Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Herpetologia,parte II p.146 - 168.

Tajima, F. 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences infinite populations. *Genetics* 105: 437-460.

Tajima, F. 1989. Statistical methods for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123- 585-595.

Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.

Templeton, A.R.; Boerwinkle, E.; Sing, C.F. 1987. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. I. Basic theory and an analysis of alcohol deshydrogenase activity in *Drosophila*. *Genetics* 117, 343-351.

Templeton, A.R.; Crandall, K.A.; Sing C.F. 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data: III. Cladogram estimation. *Genetics* 132, 619-633.

Templeton, A.R.; Sing, C.F. 1993. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping: IV. Nested analyses with cladogram uncertainty and recombination. *Genetics* 134, 659-669.

Templeton A.R., Routman E, Phillips C 1995 Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the Tiger Salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics*, 140, 767-782.

Templeton, A.R. 1998. Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Mol. Ecol.* 7:381-397.

Templeton, A. R. 2001. Using phylogeographic analyses of gene trees to test species status and processes. *Molecular Ecology* 10:779-791.

Templeton, A.R. 2004. Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. *Mol. Ecol.* Vol. 13, Issue 4: 789-809.

Templeton AR 2005 Haplotype trees and modern human origins. *Yearbook of Physical Anthropology*, 48, 33–59.

Templeton, A.R. 2008. Nested clade analysis: an extensively validated method for strong phylogeographic inference. *Molecular Ecology* 17:1877-1880.

Thompson, J. D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: 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

Vasconcelos, W., R., Hrbek T., Da Silveira, R. Thoisy, B., Marioni, B. and Farias I., P., 2006 Population genetic analysis of *Caiman crocodilus* (Linnaeus, 1758) from South America. *Genetics and Molecular Biology*, 29, 2, 220-230

Vences M., Thomas, M., Meijden A., Chiari Y., 2005, Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Frontiers in Zoology*, 2:5

Viana, M., N., S., 2005, Ecologia molecular de Quelônios do gênero *Podocnemis* (Pelomedusidae: Pleurodira) da Amazônia Brasileira. Tese de doutorado – Universidade Federal do Pará

Weir B.S., Cockerham C.C., 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358–70

Wright, S. 1931. Evolution in mendelian populations. *Genetics*, 16, 97-159.

Zimmerman, B.L.; Rodrigues, M.T. 1990. Frogs, snakes, and lizards of the INPA-WWF reserves near Manaus, Brazil. *In*: Gentry, A.H. (Ed.). *Four Neotropical Rainforest*. Yale University Press, New Haven, USA. p. 426-454.