



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**ANÁLISES MOLECULAR E MORFOMÉTRICA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE
Eupemphix nattereri, 1863 (Amphibia: Anura: Leptodactylidae) do Brasil**

Central

Daniela de Melo e Silva

Brasília-DF
2006



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

ANÁLISES MOLECULAR E MORFOMÉTRICA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE

***Eupemphix nattereri*, 1863 (Amphibia: Anura: Leptodactylidae) do Brasil**

Central

Daniela de Melo e Silva

Orientador: Prof. Dr. José Alexandre Felizola Diniz-Filho

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biologia Animal

Brasília- DF
2006

*"É melhor tentar e falhar
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.*

*Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.*

*Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver "*

Martin Luther King

*Dedico este trabalho aos meus pais,
pelo apoio incondicional.*

*Dedico este trabalho a minha filhotinha Isadora,
pelas minhas ausências e pelas nossas idas a Brasília desde cedo.*

AGRADECIMENTOS

Durante a realização deste trabalho muitas foram as pessoas que de alguma maneira me auxiliaram. Gostaria de agradecer aos meus três “orientadores”:

Prof. Dr. José Alexandre Felizola Diniz-Filho, pela idealização deste trabalho, pelas discussões, pela sua determinação e pelo grande exemplo de pesquisador sábio e brilhante. Obrigada pelo suporte científico, por sua participação efetiva em todas as etapas deste trabalho, por sua responsabilidade, confiança, amizade e sabedoria. Obrigada por ter sido o meu grandioso orientador.

Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz (Peixoto), pelas discussões, pela determinação e por ter disponibilizado o Núcleo de Pesquisas Replicon (UCG) para a realização dos trabalhos de experimentação. Agradeço ainda por sua atenção e grande amizade. Muito obrigada pelo apoio e por sempre acreditar em mim, mesmo nos momentos mais difíceis! Obrigada pelas conversas e pelo incentivo à pesquisa.

Profa. Dra. Mariana Pires de Campos Telles, pela orientação extra-oficial. Obrigada pela sua ajuda que foi fundamental na realização deste trabalho. Sem você nada disso teria sido possível. Obrigada pelas análises, pelos gráficos, pelas discussões e pela conversas. Muito obrigada pelo seu grande apoio!

Gostaria ainda de agradecer:

Ao professor Luis Maurício Bini e às professoras Cynthia Peralta de Almeida Prado, Maria de Nazaré Klautau G. Grisólia e Silviene Fabiana de Oliveira por terem aceitado o convite em participar da banca examinadora deste trabalho. Muito obrigada pela disponibilidade!

Aos profissionais responsáveis pela coleta de anfíbios, em especial, à Lorena, Leôncio e William (UFG), Prof. Dr. Masao (UFMT/MS) e Prof. Dr. Célio (UNESP/Rio Claro).

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, em especial às professoras Dra. Rosana Tidon, Dra. Silviene Fabiana e Dra. Nazaré Klautau pelos ensinamentos e pelas discussões sobre Evolução e Genética de Populações.

Ao meu grandioso marido e ilustre herpetólogo Rogério Pereira Bastos. Muito obrigada pelo apoio, pelas discussões, pelas coletas dos “sapos” durante quase dois anos. Obrigada por nossas

idas a Brasília, pelas análises de gráficos, pelas conversas a respeito de conservação, genética e diversidade biológica. Obrigada por sempre ser sincero, por ter acreditado em mim e por ter me incentivado. Desculpe-me pelas ausências, teimosias e noites em claro. Sem você eu não teria conseguido. Obrigada pelo grande exemplo de pesquisador que é, pelas batalhas e por não me deixar engolir “sapos” sempre.

A minha querida e amada filhotinha Isadora. Muito obrigada por existir na minha vida. Obrigada pela sua alegria, pelos seus abraços, gestos de carinho e companheirismo. Obrigada pelas nossas idas a Brasília (ainda na barriga da mamãe). Obrigada por ser essa filha maravilhosa e comunicativa. Te amo muito!!!

Aos meus pais Nilo e Eleuza pelo grande exemplo de vida. Além de pais são amigos carinhosos que me mostraram grandes caminhos desde quando eu era criança. Obrigada por serem pais tão presentes em minha vida. Obrigada pelos exemplos de dedicação, amor e compreensão.

A minha querida ajudante Geru por ter cuidado tão bem de minha filha enquanto estava fora. Sem você este trabalho não teria sido realizado. Muito obrigada pelo seu fundamental apoio.

Aos colegas do Núcleo de Pesquisas Replicon e alunos de monografia, em especial, ao Eduardo, ao Raimundo, à Marcela, Maria Thereza, Raquel, Daniella Cruvinel, Daniella Motta e ao Luciano, pelo apoio incondicional na realização deste trabalho, pelas reações de PCR, extrações de DNA e pelas leituras dos géis no VDS. Valeu demais!!!

Aos colegas do Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular (LaGene) da Secretaria Estadual de Saúde de Goiás, Cláudio, Jonas, Thaís, Gustavo, Fabiano, Rafael, Sandra e Cristiano pela atenção, pelas discussões e pelo convívio.

Aos meus “chefes” do LaGene, Dra. Maria Paula Curado, Dr. Aparecido Divino da Cruz (Peixoto) e Dr. Carlos Furtado por terem me “dispensado” do laboratório sempre que eu precisava de viajar ou finalizar a tese. Muito obrigada pela confiança e pelo convívio.

Aos meus grandes e fiéis amigos, Flávio, Vera e Tatiana, pelo apoio nas horas difíceis, pelas discussões e pelos vários momentos de distração e alegria. Sem vocês a vida seria bem mais difícil!

À Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Católica de Goiás e ao PRONEX [CNPq/SECTEC-GO (proc. 23234156)] por terem financiado todo o material de consumo utilizado neste trabalho.

A todos MUITO OBRIGADA!!!!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XII
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XV
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. Objetivo Geral	4
2.2. Objetivos Específicos	4
3. REVISÃO DA LITERATURA	5
3.1. A Espécie	5
3.2. Genética de Populações	10
3.3. Marcadores Moleculares	13
3.3.1 RAPD (Amplificação Randômica de DNA Polimórfico)	15
3.4. Estrutura Genética de Populações de Anfíbios	18
3.5. Implicações do Conhecimento da Estrutura Genética de Populações na Conservação de Espécies de Anfíbios	20
4. Material e Métodos	23
4.1. Área de Estudo e Grupo Amostral	23
4.2. Análise de RAPD	27
4.2.1. Extração e Quantificação das Amostras de DNA	27
4.2.2. Teste e Seleção de Oligonucleotídeos de RAPD	27
4.2.3. Reações de PCR	28
4.2.4. Seleção de Bandas para a Construção de Matrizes Binárias	29
4.3. Estimativa de Frequências Alélicas e Parâmetros Genéticos Básicos	40
4.4. Estrutura Genética Populacional	41
4.5. Distâncias Genéticas	47
4.6. Correlação entre Distâncias Genéticas e Geográficas	48
4.7. Análise de Descontinuidade Genética	49
4.8. Análises Morfométricas	50
4.9. Associação do Padrão Espacial da Variabilidade Genética com dados morfométricos, microambientais e macroambientais	53
4.10. Programas computacionais utilizados nas análises	54
5. RESULTADOS	55
5.1. Análises dos oligonucleotídeos RAPD	55
5.2. Variabilidade Genética entre e dentro de populações	59

5.3. Padrões Espaciais da Divergência Genética das Populações	70
5.4. Análise de Descontinuidade Genética	80
5.5. Análises Morfométricas	81
5.6. Associação do Padrão Espacial da Variabilidade Genética com Dados Morfométricos, Microambientais e Macroambientais	83
6. DISCUSSÃO	86
6.1. Estrutura Populacional de <i>Eupemphix nattereri</i>	86
6.2. Associações entre dados fenotípicos e genéticos	93
7. CONCLUSÕES	98
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Espécime de <i>Eupemphix nattereri</i> Steindachner, 1863.	6
Figura 2. Área de ocorrência de <i>Eupemphix nattereri</i> (em cinza).	7
Figura 3. Sonograma de quatro cantos de anúncio de <i>Eupemphix nattereri</i> . Temperatura do ar = 24°C.	9
Figura 4. Desova do tipo ninho de espuma.	9
Figura 5. Mapa das 11 localidades de coleta <i>Eupemphix nattereri</i> do Brasil Central.	26
Figura 6. Padrão de amplificação do marcador OPA13 em 07 espécimes de <i>E. nattereri</i> do município de Cristianópolis (CS). As intensidades das bandas podem ser visualizadas pelas setas. Os números de 300 a 900 referem-se ao peso molecular dos alelos, em pares de base, sendo analisados por comparações com o marcador de 100 pares de base (<i>Promega Corporation</i> , EUA).	30
Figura 7. Seleção do gel A132904, analisado no programa Total Lab 1D (<i>Amersham Pharmacia Biotech.</i> , EUA).	31
Figura 8. Gel selecionado para análise: A132904, referente ao marcador OPA13. Os cinco parâmetros utilizados nas análises podem ser visualizados no lado esquerdo da figura, destacados em vermelho.	32
Figura 9. Identificação e caracterização das 22 canaletas do gel A132904. Os códigos em preto acima das canaletas se referem aos espécimes analisados e os números de 1 a 7 à quantidade de indivíduos por localidade neste gel. RC: Rio Claro; PM: Palmeiras; CS: Cristianópolis. O primeiro poço (em verde) refere-se ao marcador de peso molecular de 100 pares de base (<i>Promega Corporation</i> , EUA).	33
Figura 10. Remoção do ruído de fundo do gel pelo método <i>rolling disc</i> , especificando o raio utilizado (50).	34
Figura 11. Detecção das bandas para análise. As bandas selecionadas estão marcados em vermelho	35
Figura 12. As três variáveis utilizadas para detecção das bandas, de cima para baixo, no lado esquerdo da figura: inclinação mínima (do inglês, <i>Minimum slope</i>) com valor de 993, redução do ruído (do inglês, <i>noise reduction</i>) e porcentagem máxima do pico (do inglês, <i>% Max. Peak</i>) de 10%.	37
Figura 13. Calibração da primeira canaleta a qual se refere ao marcador de 100 pares de base variando de 100 a 1500 pares de base.	38
Figura 14. Normalização das bandas de acordo com a banda de 1500 pares de base.	39
Figura 15. Esquema de <i>Eupemphix nattereri</i> demonstrando as 11 medidas realizadas, listadas na tabela 4.	51
Figura 16. Padrões de amplificação do oligonucleotídeo OPA13, em espécimes de <i>Eupemphix nattereri</i> , de três localidades (Q-Quirinópolis; P- Palmeiras; MO- Morrinhos). Ld- Marcador de 100 pares de base.	56
Figura 17. Resultados da análise do oligonucleotídeo OPA13, obtido de um espécime de Palmeiras, com a utilização do programa <i>Image Master 1D</i> (<i>Amersham Pharmacia Biotech.</i> , EUA). Os alelos variaram de 1104 a 3274 pares de base e a intensidade das 11 bandas analisadas variaram	58

de 25 a 90 pixels, conforme demonstrado no gráfico.

- Figura 18.** Frequência relativa dos valores de θ_p , de acordo com Lynch & Milligan, na matriz completa (HLMC), dos 82 locos analisados nas populações de *Eupemphix nattereri*. 61
- Figura 19.** Frequência relativa dos valores de θ_p , de acordo com Lynch & Milligan, na matriz parcial (HLMP), dos 53 locos analisados nas populações de *Eupemphix nattereri*. 62
- Figura 20.** Frequência relativa dos valores de θ_p , presumindo o equilíbrio de H-W, na matriz completa (HHWC), dos 82 locos analisados nas populações de *Eupemphix nattereri*. 63
- Figura 21.** Frequência relativa dos valores de θ_p , presumindo o equilíbrio de H-W, na matriz parcial (HHWP), dos 53 locos analisados nas populações de *Eupemphix nattereri*. 64
- Figura 22.** Padrão de divergência genética entre 11 populações de *Eupemphix nattereri*, definido pelo agrupamento UPGMA, com base nas distâncias genéticas Φ_{ST} . 71
- Figura 23.** Padrão de divergência genética entre 11 populações de *Eupemphix nattereri*, definido pelo agrupamento UPGMA, com base nas distâncias genéticas de Nei (θ_p), assumindo o equilíbrio de Hardy-Weinberg. 74
- Figura 24.** Padrão de divergência genética entre 11 populações de *Eupemphix nattereri*, definido pelo agrupamento UPGMA, com base nas distâncias genéticas de Nei (θ_p), utilizando-se a correção de Lynch & Milligan. 75
- Figura 25.** Padrão de divergência genética entre 11 populações de *Eupemphix nattereri*, definido pelo agrupamento UPGMA, com base nas distâncias genéticas de θ^B , de acordo com a estatística Bayesiana. 77
- Figura 26.** Correlação entre as distâncias genética (Φ_{ST}) e geográfica entre 11 populações de *E. nattereri*. 79
- Figura 27.** Resultados da análise de descontinuidade genética sobre a rede de Gabriel (1998). As setas indicam a presença de barreiras. 80
- Figura 28.** Resultado da Análise Canônica demonstrando a posição relativa de cada população. Números 1 a 9 se referem às populações de 1 a 9 listadas na tabela 8. 82
- Figura 29.** Resumo dos testes de Mantel realizados entre os dados geográficos (GEO), genéticos (GENET), morfométricos (MORFO), micro e macroambientais (MACRO). 84
- Figura 30.** Representação gráfica do teste de Mantel realizado entre as distâncias genética (Φ_{ST}) e morfométrica nas 9 populações de *E. nattereri*. 85
- Figura 31.** Mapa do Estado de Goiás ilustrando a presença de áreas desmatadas (em branco) e áreas de remanescentes florestais (em verde). 93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização das onze populações de <i>Eupemphix nattereri</i> do Brasil Central.	25
Tabela 2. Seqüências dos 40 oligonucleotídeos de RAPD	28
Tabela 3. Esquema de Análise de Variância Molecular (AMOVA).	44
Tabela 4. Medidas morfométricas realizadas para os 132 espécimes de <i>E. nattereri</i> .	51
Tabela 5. Oligonucleotídeos selecionados para as análises populacionais.	55
Tabela 6. Número e porcentagem de locos polimórficos por oligonucleotídeo na matriz completa.	57
Tabela 7. Relação dos locos excluídos na confecção da matriz binária parcial.	59
Tabela 8. Heterozigose (h) e porcentagem de locos polimórficos (LP), por população de <i>Eupemphix nattereri</i> , nas matrizes completa (MC) e parcial (MP), de acordo com Lynch & Milligan (1994).	60
Tabela 9. Heterozigose (h) e porcentagem de locos polimórficos (LP), por população de <i>Eupemphix nattereri</i> , nas matrizes completa (MC) e parcial (MP), assumindo o equilíbrio de Hardy-Weinberg.	62
Tabela 10. Análise de Variância Molecular (AMOVA) baseada em 82 locos RAPD para 11 populações de <i>Eupemphix nattereri</i> amostradas no Brasil Central.	66
Tabela 11. Valores de ϕ_{ST} par a par para as 11 populações de <i>Eupemphix nattereri</i> , com base em 82 locos RAPD (matriz completa).	66
Tabela 12. Resultados da análise bayesiana de variabilidade para as 11 populações de <i>Eupemphix nattereri</i> , em relação aos quatro modelos testados (<i>full</i> , $f=0$, $\theta^B=0$ e <i>free f</i>).	69
Tabela 13. Resultados da análise bayesiana de divergência para as 11 populações de <i>Eupemphix nattereri</i> , na matriz completa, demonstrando as estimativas de f , θ^B , a medida da informação I_e e a distância H-d entre a distribuição <i>a posteriori</i> para os quatros modelos testados.	69
Tabela 14. Resultados da análise bayesiana de divergência para as 11 populações de <i>Eupemphix nattereri</i> , na matriz parcial, demonstrando as estimativas de f , θ^B , a medida da informação I_e e a distância H-d entre a distribuição <i>a posteriori</i> para os quatros modelos testados.	69
Tabela 15. Valores de θ_p par a par entre 11 populações de <i>Eupemphix nattereri</i> , com base em 82 locos RAPD (matriz completa), assumindo o equilíbrio de Hardy-Weinberg.	72
Tabela 16. Valores de θ_p par a par entre 11 populações de <i>Eupemphix nattereri</i> , com base em 82 locos RAPD (matriz completa), de acordo com a correção de Lynch & Milligan (1994).	73
Tabela 17. Valores de θ^B par a par entre 11 populações de <i>Eupemphix nattereri</i> , com base em 82 locos RAPD (matriz completa), de acordo com a correção de Lynch & Milligan (1994).	76
Tabela 18. Correlação linear simples entre as distâncias genéticas baseadas em três coeficientes [$(\theta^B$, Φ_{ST} e θ_p , (HW e LM)]. As correlações foram significativas com $p < 0,05$.	78
Tabela 19. Resultados da Análise de Variância dos 11 caracteres morfométricos analisados, demonstrando os valores de F e r^2 .	81
Tabela 20. Coeficientes canônicos das variáveis originais logaritimizadas nos primeiros dois eixos.	82
Tabela 21. Relação dos valores dos estimadores de estrutura populacional em diferentes grupos.	87

RESUMO

A diversidade genética é necessária para a adaptação das populações a mudanças ambientais, podendo ser medida por métodos quantitativos e moleculares. O conhecimento da variabilidade de uma espécie é também fundamental para a conservação, sendo uma característica de destaque. Para determinar a diversidade genética de uma espécie, há a necessidade de avaliar a estrutura genética populacional, ou seja, a distribuição heterogênea e não aleatória dos alelos e genótipos no espaço e no tempo, resultante da ação de forças evolutivas tais como mutação, migração, seleção e deriva genética, que atuam diferentemente dentro do contexto de cada espécie e população. Desta forma, visando conhecer a estrutura genética da espécie *Eupemphix nattereri*, análises moleculares foram realizadas em 11 populações deste leiuperídeo, localizadas no Brasil Central (Goiás, São Paulo e Mato Grosso). Tais análises genéticas foram realizadas com marcadores domintantes do tipo RAPD. Além disto, foram feitas análises de 11 caracteres morfométricos dos espécimes de *Eupemphix nattereri* coletados somente em Goiás. Correlações entre as distâncias geográficas, morfométricas, genéticas e dados macro e microambientais foram analisadas com a utilização do teste de Mantel. Foram encontrados altos níveis de diversidade genética entre as onze populações, de acordo com três metodologias diferentes (θ_p , Φ_{st} e θ^B), as quais estimaram coeficientes de divergência em torno de 0,30. O teste de Mantel não demonstrou uma correlação estatisticamente significativa entre as distâncias genéticas e geográficas, indicando que locais geograficamente próximos não seriam geneticamente similares, mesmo estando situados entre distâncias menores do que 50 km. A análise discriminante dos onze caracteres morfométricos demonstrou uma sobreposição espacial das variáveis analisadas nas nove populações, indicando, contudo, uma tendência para uma correlação estatisticamente significativa ($p = 0,08$) entre as distâncias genética e morfométrica. Tal correlação não é casual entre o fenótipo e o genótipo, indicando estruturas espaciais comuns. Além disto,

processos de isolamento por distância, apesar do baixo poder estatístico das análises, poderiam explicar a divergência populacional de *Eupemphix nattereri*. Assim, nossos resultados demonstraram que as populações de *Eupemphix nattereri* não estão estruturadas no espaço, apresentando uma distribuição aleatória e os dados genéticos indicaram ausência de isolamento por distância e de fluxo gênico conectando as populações.

Palavras Chave: *Eupemphix nattereri*, morfometria, RAPD, fluxo gênico, estrutura populacional.

ABSTRACT

Genetic diversity is necessary to the adaptation of populations to environmental changes, and could be measured by quantitative and molecular methods. The knowledge of species variability is also fundamental for conservation, and is an important characteristic. To assess species genetic diversity, population genetic structure must be evaluated, which means, the knowledge of heterogeneous distribution of non random alleles and genotypes in space and time, as a result of evolutive process such as mutation, migration, natural selection and genetic drift, that act distinctly in the context of each species and population. To verify the genetic structure of *Eupemphix nattereri*, molecular analyses were conducted in 11 populations of this leiuperid, sampled in Central Brazil (Goias State, Rio Claro and Mato Grosso do Sul). Such analyses were estimated using dominant RAPD markers. Besides, 11 morphometric characters were evaluated only in populations of Goias State. Genetic and morphometric matrixes were analyzed as a function of geographical origin. Correlation among genetic, geographical, morphometric, micro and macroenviromental were analyzed by the Mantel test. Genetic data indicated high levels of genetic diversity (around 0.30), according to three different approaches (Φ_{ST} , θ_P and θ^B), among the eleven populations. Mantel tests did not reveal a significant positive correlation between genetic variation and geographical distance, indicating that locally geographical populations are not genetically similar, even in distances smaller than 50 km. Discriminant analysis on 11 measurements showed considerable overlap between populations from different geographical areas, but there is a marginally significant correlation ($p= 0.08$) between genetic and morphometric distances. This correlation is not causal in terms of the relationship between phenotype and genotype, and indicates common spatial structures. Thus, isolation-by-distance processes, despite the low statistical power in the analyses, could explain population divergence in *Eupemphix nattereri*. So, our results indicated that *Eupemphix nattereri* populations were not

structured in space, showing a random distribution. Besides, genetic data demonstrated lack of isolation-by-distance and lack of gene flow connecting populations.

Key Words: *Eupemphix nattereri*, morphometrics, RAPD, gene flow, population structure.

1- INTRODUÇÃO

A diversidade genética é necessária para a adaptação das populações a mudanças ambientais, podendo ser medida através de métodos quantitativos e moleculares. Para determinar a diversidade genética de uma espécie há a necessidade de avaliar a estrutura genética populacional, ou seja, a distribuição heterogênea e não aleatória dos alelos e genótipos no espaço e no tempo, resultante da ação de forças evolutivas tais como mutação, migração, seleção e deriva genética, que atuam, diferentemente, dentro do contexto de cada espécie e população (Hamrick, 1982).

Estruturas populacionais são altamente variadas, havendo populações únicas, cujos indivíduos apresentam iguais oportunidades de cruzamento, sendo caracterizadas como populações panmíticas. Além disso, as populações podem ser diferenciadas, devido a barreiras geográficas, como estradas ou rios, em grupos de indivíduos (subpopulações) que tem mais chances de cruzar entre si do que entre indivíduos de outras subpopulações (Beebee & Rowe, 2004). Uma variante desta situação surge quando os organismos compõem metapopulações, com múltiplas subpopulações caracterizadas por extinções e recolonizações locais (Hanski, 1998).

Dessa forma, o conhecimento da estrutura genética de populações é uma etapa fundamental para a compreensão da ação de fatores evolutivos e na realização de programas conservacionistas. Em populações de anfíbios, numerosos estudos têm contribuído para o entendimento de fenômenos ecológicos e evolutivos (Newman 1992; Wilbur, 1997; McDiarmid & Altig, 1999, Funk *et al.*, 2005; Wagner *et al.*, 2005). Este grupo é um bom modelo para se investigar a genética de populações naturais porque está amplamente distribuído na maioria dos

ecossistemas, é fácil de coletar, geralmente apresenta fidelidade ao local de reprodução, gerando altos níveis de estrutura populacional (Newman 1992; Wilbur, 1997; McDiarmid & Altig, 1999; Beebee, 2005; Wagner *et al.*, 2005).

Vários estudos têm empregado métodos de captura, marcação e recaptura que permitem inferir que populações próximas de anfíbios interagem por imigração/emigração e fluxo gênico (Funk *et al.*, 2005). Contudo, tais espécies, geralmente, exibem fidelidade ao sítio de reprodução, o que pode limitar trocas de genes entre populações locais (Newman & Squire, 2001).

Marcadores genéticos têm sido utilizados em pesquisas de estrutura populacional e de tamanhos efetivos de populações de anfíbios (Gordon, 1998; Neveu *et al.*, 1998; Degen *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2002; Beebee, 2005; Spear *et al.*, 2005; Wagner *et al.*, 2005; Telles *et al.*, 2006). Com a técnica de PCR, marcadores baseados em sequências de DNA são capazes de inferir os processos microevolutivos responsáveis por variações, auxiliando no entendimento da dinâmica populacional de uma espécie. Assim, pode-se verificar a variabilidade genética entre indivíduos, populações e espécies (Awise, 1994; Buso *et al.*, 1998; Zhang & Hewitt, 2003).

A junção de fatores genéticos, demográficos e ambientais contribui para a viabilidade de populações ou espécies (Alford & Richards, 1999; Young *et al.*, 2001; Andersen *et al.*, 2004). Uma vez que a caracterização molecular da variação genética se tornou possível, um grande número de publicações tem comparado este tipo de variação com estimativas de divergência em traços morfológicos, comportamentais e ontogenéticos (Babik & Rafinski, 2000; Gómez-Mestre & Tejedo, 2004; Rissler *et al.*, 2004; Rosso *et al.*, 2004).

Comparando-se padrões de diferenciação genética populacional em marcadores neutros com traços quantitativos, pode-se inferir o papel da seleção natural na divergência populacional, contrastando o grau de mudança adaptativa com a diferenciação ocasionada somente pela deriva. Alguns estudos a respeito da variação geográfica em caracteres morfométricos de anfíbios evidenciaram causas tanto adaptativas, como a plasticidade fenotípica, quanto não adaptativas, como a deriva genética (Blouin, 2000; Castellano *et al.*, 2000).

O presente estudo teve como objetivo principal descrever a estrutura genética do anfíbio anuro *Eupemphix nattereri* Steindachner, 1863 (Amphibia: Anura: Leptodactylidae), com a utilização do marcador dominante RAPD (Amplificação Randômica de DNA polimórfico). Além disto, possíveis correlações entre distâncias genéticas e geográficas foram examinadas, assim como padrões de variação em onze caracteres morfométricos, utilizando técnicas de análise multidimensional. O objetivo principal foi caracterizar a variabilidade genética entre e dentro de populações naturais de *Eupemphix nattereri* e quais os fatores estão associados a ela.

2. OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral

- ✓ Descrever e analisar as estruturas genética e morfométrica de populações naturais de *Eupemphix nattereri* (Amphibia: Anura: Leptodactylidade) do Brasil Central.

2.2- Objetivos Específicos

- ✓ Caracterizar a genética populacional de *Eupemphix nattereri*, pela utilização de marcadores RAPD, verificando a variabilidade genética inter e intrapopulacional e padrões espaciais com técnicas de autocorrelação espacial;
- ✓ Estabelecer correlações entre caracteres fenotípicos (comprimento do corpo e membros) e dados genéticos, obtidos dos mesmos indivíduos e populações, assim como entre dados geográficos, micro e macroambientais, utilizando o teste de Mantel.
- ✓ Verificar, por análises de descontinuidade genética, se os padrões espaciais da variabilidade genética encontrados podem ser explicados por interrupções do fluxo gênico e isolamento geográfico causados por processos associados à fragmentação de habitats.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 - A Espécie

Atualmente são conhecidas no mundo cerca de 5300 espécies de anfíbios anuros (AmphibiaWeb, 2006), sendo que a maior riqueza é encontrada na região Neotropical. O Brasil abriga a maior riqueza de anuros do planeta, com 776 espécies registradas até o momento (SBH, 2005). No estado de Goiás estão registradas mais de 70 espécies de anuros, o que corresponde a 9,4% da diversidade brasileira. Entretanto, a anurofauna de regiões interioranas, como o Planalto Central permanece pouco conhecida (Brandão & Araújo, 1998; Bastos *et al.*, 2003) e comparações a respeito da morfologia e genética de populações de vários anfíbios anuros são escassas no Brasil, sendo desconhecidas para a maioria das espécies brasileiras.

As espécies pertencentes à família Leptodactylidae têm hábitos terrestres, fossoriais, arbóreos e aquáticos. Os leptodactilídeos são extremamente variáveis no tamanho, tendo comprimento entre 12 a 250 mm. Um dos gêneros desta família, o *Eupemphix* foi descrito por Steindachner (1863) para a espécie *Eupemphix nattereri* (Amphibia: Anura: Leptodactylidae) encontrada em Cuiabá, capital do Mato Grosso, Brasil (Nascimento *et al.*, 2005). O nome específico é em homenagem ao naturalista Johann Natterer, que pesquisou a fauna brasileira no século XIX (Bastos *et al.*, 2003). *Eupemphix nattereri* (Figura 1) é uma rã que se encontra amplamente distribuída na América do Sul, ocorrendo desde o leste do Paraguai até as regiões Centro-Oeste e Sudeste do Brasil (Ceil, 1980; Frost, 2006) (Figura 2).



Figura 1. Espécime de *Eupemphix nattereri* Steindachner, 1863. **Foto:** R.P. Bastos (2004).



Figura 2. Área de ocorrência de *Eupemhix nattereri* (em cinza).

Fonte: Frost (2006) Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 4 (17 August 2006). Electronic. American Museum of Natural History, New York, USA. <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php>.

Eupemphix nattereri caracteriza-se por apresentar cabeça larga, focinho curto, coloração geral do dorso marrom com faixas dorsais transversais mais escuras (Figura 1). Na região inguinal, há duas grandes glândulas ocelares de cor preta. Quando se encontra ameaçado por um predador, pode mostrar essas glândulas com o objetivo de afugentá-lo, sendo tal comportamento denominado deimático (Sazima & Caramaschi, 1986, Bastos *et al.*, 2003, Lenzi-Mattos *et al.*, 2005).

Na estação reprodutiva, machos e fêmeas são encontrados em brejos permanentes e temporários de áreas abertas, logo após o início da estação chuvosa. A estação reprodutiva pode se estender por vários meses, caracterizando o padrão reprodutivo da espécie como prolongado (Wells, 1977). A partir de sítios localizados na margem de poças d'água, os machos vocalizam cantos de estrutura harmônica, incluindo duetos e trios (Duellman & Trueb, 1994) (Figura 3). O amplexo é axilar e os ovos são depositados em ninhos de espuma, sobre a água (Figura 4) (Duellman & Trueb, 1986; Bastos *et al.*, 2003). Para a produção do ninho, o macho bate com as pernas o muco que é liberado com os ovos durante a desova, enquanto está em amplexo com a fêmea (Bastos *et al.*, 2003).

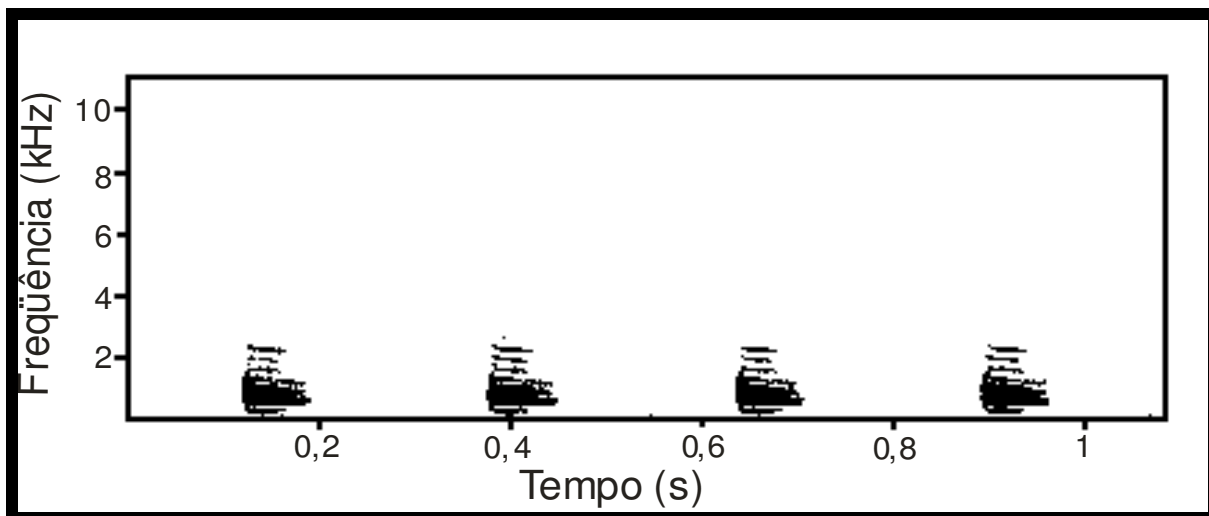


Figura 3. Sonograma de quatro cantos de anúncio de *Eupemphix nattereri*.
Temperatura do ar = 24,0°C.



Figura 4. Desova do tipo ninho de espuma
Foto: R.P. Bastos

3.2- Genética de Populações

A genética das populações lida com as conseqüências dos princípios mendelianos sobre a composição da população, com especial referência aos efeitos de mutações, seleção, migração e flutuação ao acaso das freqüências gênicas. Todos estes fatores juntos determinam a estrutura genética da população. Além disto, esta área da genética procura compreender e fazer previsões dos efeitos de fenômenos genéticos como a segregação, recombinação, transposição e mutação sobre as populações, considerando fatores ecológicos e evolutivos como a dimensão da população, padrões de reprodução, distribuição geográfica de indivíduos, migração e seleção (Vogel & Motulsky, 2000, Hedrick, 2005).

As questões freqüentemente abordadas em genética de populações incluem: i) a amplitude da variação genética encontrada nas populações naturais, ii) os processos evolutivos que moldam a estrutura genética das populações, iii) os processos responsáveis pelo surgimento de divergência genética entre populações, iv) a influência das características biológicas das populações, tais como o tipo de reprodução, a fecundidade e estrutura etária, assim como o pool gênico das populações (Beebee & Rowe, 2004).

A base da genética de populações é o princípio de Hardy-Weinberg, que foi demonstrado independentemente pelo matemático inglês G.H.Hardy e pelo médico alemão W. Weinberg, em 1908. Seu enunciado é o seguinte: “Para qualquer *locus* gênico, as freqüências relativas dos genótipos, em populações de cruzamento ao acaso (panmíticas), permanecem constantes, de geração a geração, a menos que certos fatores perturbem este equilíbrio” (Li 1976, Vogel & Motulsky, 2000, Solé-Cava, 2001, Hedrick, 2005).

Esses fatores são chamados de fatores evolutivos: mutação, seleção, deriva genética (ou oscilação genética) e migração (fluxo gênico). Assim, para que uma população esteja em equilíbrio de Hardy-Weinberg, deve atender às seguintes premissas:

- a- estar livre da ação dos fatores evolutivos;
- b- ser uma população panmítica;
- c- apresentar proporção sexual de 1:1;
- d- constituir uma população formada por um grupo de organismos da mesma espécie que se reproduzem sexuadamente e residem dentro de limites geográficos definidos, permitindo o intercruzamento (Li, 1976, Beiguelman, 1994; Vogel & Motulsky, 2000, Solé-Cava, 2001).

Entretanto, para cada *locus* gênico considerado, quando algum dos fatores evolutivos atua, causando o desequilíbrio das frequências gênicas e genotípicas, basta uma geração de cruzamentos ao acaso, sem ocorrência de fatores evolutivos, para que o equilíbrio de Hardy-Weinberg se reestabeleça. As mutações podem surgir ao acaso, ou seja, um gene mutante que aumente a viabilidade dos indivíduos pode levar ao aumento de sua frequência no conjunto gênico da população. Nas populações, os diferentes fenótipos não têm a mesma viabilidade, sendo que a eliminação ou redução de genes menos viáveis pode provocar alteração nas frequências gênicas de uma geração a outra por seleção natural. As migrações também podem introduzir ou retirar alelos das populações, o que pode provocar mudanças nas frequências gênicas e genotípicas. A estabilidade das frequências gênicas varia conforme o tamanho das populações. Nas pequenas

populações, as freqüências alélicas estão mais susceptíveis aos efeitos da deriva genética (Vogel & Motulsky, 2000; Beebee & Rowe, 2004).

A estratégia utilizada para estudos populacionais é o uso de marcadores, podendo ser morfológicos e/ou moleculares (proteínas, enzimas, marcadores imunológicos e de DNA), sendo estes últimos os mais utilizados atualmente. Suas principais características são: o padrão simples e inequívoco de herança, fenótipos identificados com boa exatidão e freqüência relativamente alta de cada um dos alelos que lhe são pertinentes (ou pelo menos um grande número de alelos). Assim, marcadores moleculares, como minissatélites, microsatélites, RAPD (amplificação randômica de DNA polimórfico), RFLP (polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição) e DNA mitocondrial, permitem a identificação e inferências de parentesco, distâncias genéticas relativas, fundadores de novas populações, indivíduos não identificados, estrutura das populações e tamanho populacional efetivo (Solé-Cava, 2001; Beebee & Rowe, 2004)

A escolha do marcador depende da adequação do grau de polimorfismo do mesmo ao tipo de divergência evolutiva a ser estudada. Marcadores que evoluem rapidamente são úteis para o estudo de indivíduos, famílias e populações, enquanto que marcadores que evoluem mais lentamente são mais bem estudados na avaliação de espécies. Outros critérios importantes na escolha são: o tipo de material disponível para estudos e que o problema a ser estudado esteja bem definido (Beebee & Rowe, 2004).

3.3. Marcadores Moleculares

Existem muitas maneiras de se acessar a estrutura genética de populações e verificar o grau de variabilidade existente em uma determinada espécie (Ferreira & Grattapaglia, 1998). O mais simples indicador de variabilidade genética é a própria variabilidade morfológica. Porém, características morfológicas quase sempre são influenciadas pelo ambiente, apresentando variação contínua e grande plasticidade. (Blouin, 2000; Castellano *et al.*, 2000). Neste sentido, as técnicas em biologia molecular permitem hoje a observação de polimorfismo diretamente na seqüência de DNA de organismos. Os marcadores moleculares abriram novas perspectivas para pesquisas em biologia populacional e conservação de espécies como um todo e têm sido largamente utilizados no monitoramento da variabilidade genética (Hedrick, 2005).

Marcadores moleculares apresentam um grande potencial para estudos populacionais, permitindo realizar uma análise genômica que possa identificar a variabilidade em dois níveis básicos: 1) diferenças entre espécies e 2) variabilidade intra-específica ou interpopulacional (Garay & Dias, 2001). A introdução da técnica de eletroforese de isoenzimas no início da década de 60, além de introduzir a era dos marcadores moleculares, ampliou o número de marcadores que poderiam ser utilizados (Sole-Cava, 2001, Zucchi, 2002).

Do ponto de vista da aquisição de dados, pode-se dizer que a eletroforese de isoenzimas, empregada em escala populacional, representou uma revolução para a genética de populações: pela primeira vez foi possível ter acesso a um grande número de locos em qualquer organismo, utilizando apenas, muitas vezes, uma amostra de tecido (Solé-Cava, 2001). A utilização de isoenzimas permitiu a

detecção de polimorfismo em espécies que não mostravam diferenças morfológicas e têm sido usadas visando o estudo detalhado de um loco e as suas variantes alélicas, assim como a utilização de muitos locos para estudos populacionais (Moraes, 1997; Telles, 2000; Sebben, 2001).

Genes nucleares são, sem dúvida, importantes para o estudo da biodiversidade. Um pequeno componente do genoma é responsável pelas proteínas estruturais ou enzimáticas estando deste modo sob considerável pressão seletiva, a qual determina a adaptabilidade a um determinado ambiente. Outros tipos de variabilidade podem, ainda, ser encontradas, sem que exista uma clara pressão seletiva, de maneira que uma mutação poderá ser considerada como neutra nas condições específicas em que se encontra. A neutralidade é um conceito baseado na falta de provas a favor da seleção natural (Garay & Dias, 2001). O mais importante do ponto de vista da biologia populacional é o fato de que marcadores moleculares diferentes podem ter taxas de substituição/evolução diferentes, permitindo estudar e inferir diversos aspectos ecológico-evolutivos (Solé-Cava, 2001).

O surgimento da técnica da Reação em Cadeia da DNA polimerase (PCR) na década de 80, desenvolvida por Mullis & Faloona (1987), permitindo a síntese enzimática de milhões de cópias de um segmento específico de DNA, provocou uma verdadeira revolução nas técnicas de biologia molecular, facilitando muito o trabalho de laboratório. AFLPs, RAPDs, SSRs, são exemplos dos muitos marcadores baseados em PCR, que abriram novas e inúmeras possibilidades de utilização do polimorfismo encontrado na molécula de DNA (Bebbe & Rowe, 2004). Algumas variações desta metodologia levaram ao desenvolvimento de técnicas

poderosas na análise de diversidade genética, como o RAPD que será descrito no próximo tópico.

Conforme Solé-Cava (2001) e Garay & Dias (2001) os marcadores genéticos apresentam uma série de aplicações, que estão destacadas abaixo:

- (1) Estimar os níveis de heterozigose, além de relacioná-los com parâmetros importantes na sobrevivência das espécies, como eficiência reprodutiva e resistência a doenças;
- (2) Analisar estruturas familiares, os efeitos da reprodução assexuada na população e determinar o sexo de animais com pouco dimorfismo sexual externo;
- (3) Estimar o tipo de distribuição espacial e temporal das populações em relação ao fluxo gênico, permitindo desenhar políticas adequadas de parques e reservas;
- (4) Verificar a biodiversidade nominal e os níveis de endemismo e cosmopolitismo das espécies através de estudos de sistemática molecular;
- (5) Identificar e acompanhar a dispersão de espécies bioinvasoras.

3.3.1- RAPD (Amplificação Randômica de DNA polimórfico)

Para certos tipos de análise, a reação de PCR específica apresenta um grande fator limitante: o seu uso em larga escala (p.ex: vários locos) requer o conhecimento dos nucleotídeos que compõem as duas extremidades da seqüência de DNA que se deseja amplificar (Garay & Dias, 2001). Entretanto, o emprego da técnica de RAPD não requer o conhecimento das seqüências *a priori* que se quer amplificar, possibilitando a utilização da técnica em organismos sem o conhecimento das seqüências de DNA. Tal metodologia baseia-se na utilização de apenas um *oligonucleotídeo* na reação de PCR, ocasionando a amplificação ao

acaso de segmentos de DNA no genoma. A reação de RAPD ocorre devido ao pareamento de um iniciador único em pontos próximos do genoma, delimitando a região que está sendo amplificada (Williams et al., 1990; Welsh & McClelland, 1990).

Após a amplificação ao acaso dos fragmentos de DNA, o gel pós eletroforese é analisado, podendo ser observado para um determinado loco a presença ou ausência de uma determinada banda, uma vez que tal marcador de DNA é dominante ao nível fenotípico, ou seja, o fenótipo eletroforético de um indivíduo heterozigoto para um determinado loco não pode ser distinguido de um indivíduo homozigoto para o alelo amplificado (Solé-Cava, 2001). Assim, o polimorfismo é detectado pela visualização (presença) de uma determinada banda em uma amostra e da ausência em outra amostra (Ferreira & Grattapaglia, 1998). O fato de os oligonucleotídeos para RAPD serem construídos ao acaso é o que torna a técnica simples e aplicável a qualquer organismo, proporcionando economia de tempo e recursos financeiros (Cushwa & Medrano, 1996; Buso *et al.*, 1998; Rabouam *et al.*, 1999; Almeida *et al.*, 2003, Cavallari, 2004, Hassanien *et al.*, 2004).

Desta forma, o RAPD é uma das classes de marcadores utilizada para estudar a estrutura genética de muitas espécies (Haig *et al.*, 1994, Gordon, 1998; Neveu *et al.*, 1998; Degen *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2002; Telles, 2005, Paduan *et al.*, 2006). Este tipo de marcador molecular pode ser utilizado de forma rápida, devido ao custo relativamente baixo por reação, à pequena quantidade de DNA necessária e à maneira simples de adquirir dados de variação no DNA genômico (Welsh and McClelland 1990; Hadrys *et al.*, 1992). Marcadores RAPD são adequados para análises genéticas por permitirem o estudo da variabilidade em vários níveis

taxonômicos (Hardy, 2003) e, além disso, são considerados marcadores neutros, não apresentando efeitos fenotípicos (Avisé, 1994).

Adicionalmente, como os fragmentos de RAPD são randomicamente distribuídos ao longo do genoma, altos níveis de polimorfismo podem ser detectados (Wu *et al.*, 2002). A maioria das comparações entre os diferentes tipos de marcadores indica que os marcadores RAPD e isoenzimas revelam padrões similares de diversidade genética, mas os primeiros tendem a fornecer “marcas” relativamente específicas de populações, raças ou espécies (Peakall *et al.*, 1998). Segundo Lynch & Milligan (1994), o uso deste tipo de marcador possibilita, ainda, uma amostragem aleatória mais ampla do genoma do que aquelas proporcionadas por outras classes de marcadores.

Todavia, a maior limitação da técnica de RAPD é o fato de não ser possível discriminar genótipos de heterozigotos de genótipos de homozigotos, sendo assim um marcador menos informativo do que os marcadores codominantes (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Como consequência da característica dominante, não é possível se estimar a frequência alélica ou gênica, porém a estrutura genética de populações tem sido tradicionalmente estudada através dos desvios na frequência alélica em relação ao esperado para o equilíbrio de Hardy-Weinberg (Excoffier *et al.*, 1992). O número de alelos por loco, as heterozigoses observada e esperada têm sido os parâmetros genéticos mais utilizados para quantificar a variabilidade genética em populações naturais (Cavallari, 2004).

A limitação dos marcadores RAPD pode ser contornada por algumas maneiras. Primeiramente, pode-se assumir que a população está em equilíbrio de Hardy-Weinberg e, considerando as ausências de bandas como homólogas, as

frequências alélicas podem ser estimadas (Lynch & Milligan, 1994; Buso *et al.*, 1998; Fischer *et al.*, 2000). Outra estratégia é a utilização dos estimadores não-tendenciosos para frequências alélicas propostos por Lynch & Milligan (1994). Finalmente, outra alternativa para o uso de dados gerados via RAPD seria a utilização da Análise de Variância Molecular (AMOVA, Excoffier *et al.*, 1992).

Com algumas modificações e adaptações, a mensuração da diversidade genética de uma espécie ou população pode adotar abordagens clássicas como as estatísticas F de Wright (1965), análise de diversidade gênica em populações subdivididas (Nei, 1977), os coeficientes de coancestralidade de Cockerham (Cockerham, 1969; Weir, 1996) e estatística bayesiana (Shoemaker *et al.*, 1998; Ayres & Balding, 1998; Coelho, 2002, Telles *et al.*, 2006).

3.4-Estrutura Genética de Populações de Anfíbios

Adicionalmente aos múltiplos fatores extrínsecos que afetam a dinâmica das populações de anfíbios, os efeitos intrínsecos associados à composição genética populacional também devem ser considerados. Estudos genéticos fornecem informações a respeito das variações inter e intrapopulacionais, tornando possível a verificação de se as populações são contínuas ou estão parcialmente separadas por barreiras geográficas, assim como do risco de endogamia (Beebee, 1996).

Em geral, populações grandes são capazes de manter altas taxas de variação genética em relação a pequenas populações, embora os processos de manutenção e retenção de populações pequenas por várias gerações possam sofrer a ação da deriva genética, ocasionando a perda de alelos ao acaso e não

pela ação da seleção natural. A viabilidade da população a longo termo será maior quanto maior a diversidade genética, pois as chances dos diferentes genótipos suportarem mudanças ambientais ou flutuações são elevadas. Como as taxas de mutação são relativamente baixas em comparação com a velocidade que as populações mudam de tamanho, se a diversidade for perdida, demora-se muito para ser recuperada, mesmo se a população expandir novamente (Beebee, 1996).

Desde os anos 90, estudos de populações de anfíbios com marcadores isoenzimáticos têm verificado altas taxas de diversidade genética entre populações, evidenciando isolamento por distância e ausência de fluxo gênico (Reh & Seitz, 1990). Com a utilização de marcadores de DNA, estudos populacionais de anfíbios têm se intensificado (Rowe *et al.*, 1998; Seppä & Laurila, 1999; Rafinski & Babik, 2000; Hranitz & Diehl, 2000; Bos & Sites, 2001; Newman & Squire, 2001; Trakimas *et al.*, 2003; Platz & Grudzien, 2003; Lampert *et al.*, 2003; Zeisset & Beebee, 2003; Palo *e al.*, 2004; Méndez *et al.*, 2004; Kraaijeveld-Smit *et al.*, 2005; Spear *et al.*, 2005; Funk *et al.*, 2005; Wagner *et al.*, 2005; Telles *et al.*, 2006).

Na América do Norte, para a salamandra *Notophthalmus viridiscens*, foram encontradas correlações significativas em 04 de 05 *locos* com características ambientais e no anuro *Bufo viridis*, dois alelos em particular sofreram mudanças nas freqüências em relação à pluviosidade, ao longo da área na qual as populações estavam localizadas (Beebee, 1996).

Em análises genéticas de 123 urodelos e em 66 espécies de anuros, é aparente que a diversidade genética, principalmente a proporção de indivíduos heterozigotos está significativamente relacionada com o tipo de habitat. Em geral, os anfíbios têm altos níveis de heterozigose (em média 0,073) quando comparados

com outros vertebrados, sendo que estes valores mais altos são encontrados em habitats tropicais e os mais baixos nos habitats aquáticos e subterrâneos (Beebee, 1996).

A estrutura genética de populações insulares dos anuros *Rana temporaria* e *Bufo bufo*, em um arquipélago ao norte do Báltico, baseada em isoenzimas (Seppä & Laurilla, 1999) evidenciou altas taxas de diferenciação genética entre as populações, devido à baixa mobilidade e fidelidade ao local de reprodução destas espécies. No trabalho de Newman & Squire (2001) foram investigadas, utilizando marcadores microssatélites, doze populações de *Rana sylvatica*, localizadas entre distâncias menores do que 2 km. Neste caso, não foi evidenciada subdivisão populacional indicando um alto fluxo gênico. Desta forma, os trabalhos de estrutura populacional de anfíbios relatam que, em geral, populações de anfíbios exibem um alto grau de estrutura espacial, principalmente quando distâncias interpopulacionais excedem vários quilômetros (Newman & Squire, 2001). Além disso, também há a indicação de que em uma grande variedade de espécies a diferenciação só é aparente em escalas menores do que 2 km, ao menos que haja uma barreira geográfica (Hitchings & Beebee, 1997).

3.5. Implicações do Conhecimento da Estrutura Genética de Populações na Conservação de Espécies de Anfíbios

A preservação da diversidade genética se tornou o objetivo da maioria dos programas de conservação e compreender a distribuição desta diversidade entre e dentro de populações naturais é o primeiro passo (Bekessy *et al.*, 2002). O conhecimento do modo como a variação genética de uma espécie está distribuída

entre e dentro de suas populações é essencial para a sua conservação (Reis, 1999). Atualmente, a caracterização da estrutura genética de populações é uma das etapas para a realização de programas conservacionistas (Sharma *et al.*, 2000, Cavallari, 2004; Telles, 2005). Os dados gerados por pesquisas em genética de populações podem ser utilizados para definir unidades de conservação, preservando ao máximo a estrutura genética populacional de uma espécie (Cavallari, 2004).

Segundo a metodologia proposta por Diniz-Filho & Telles (2002), populações locais distantes entre si a uma distância geográfica menor do que o intercepto dos correlogramas espaciais podem ser consideradas como Unidades Operacionais, ou seja, unidades genéticas que seriam independentes para a conservação da variabilidade genética. No estudo realizado por Telles (2005), com marcadores RAPD, populações de *Physalaemus cuvieri*, distantes entre si cerca de 180 km, poderiam ser consideradas unidades genéticas independentes para a conservação da variabilidade genética daquela espécie. Com a utilização da configuração espacial das 18 populações analisadas geneticamente, a autora propôs um conjunto mínimo de populações que permitiram a manutenção da maior parte da diversidade genética.

No trabalho realizado por Funk *et al.* (2005) foram evidenciadas altas taxas de dispersão em *Rana luteiventris*, indicando que a dispersão exerce um importante papel na dinâmica populacional de alguns anfíbios e que o isolamento destas populações através de fragmentação de habitats pode aumentar as taxas de extinção. A dispersão em anfíbios pode ser impedida ou dificultada por estradas, urbanização ou desmatamento (Hitchings & Beebee, 1997; Jonhston & Frid, 2002),

por isso a manutenção da conexão do habitat deve ser uma prioridade para a conservação deste grupo (Funk *et al.*, 2005).

Wagner *et al.* (2005) analisando quinze populações da salamandra de montanhas (*Plethodon larselli*, Burns, 1954) localizadas ao longo do rio Columbia, nos Estados Unidos, utilizando marcadores RAPD e DNA mitocondrial, também sugeriram unidades de conservação para aquela espécie. Baseados em barreiras geográficas presentes no rio Columbia, diferenças nos haplótipos e na estrutura populacional entre populações localizadas ao norte e ao sul deste rio, os autores indicaram a designação de unidades de manejo separadas para cada região, mantendo desta forma cada unidade. Contudo, os autores identificaram que tais populações eram altamente divergentes do ponto de vista genético.

Desta forma, a conservação de espécies depende da manutenção de sua diversidade genética no habitat natural e, conforme Martins (1988) a biologia evolutiva e a genética populacional visam oferecer um conjunto de princípios fundamentais para estratégias de preservação, mantendo ou possibilitando a continuidade dos processos evolutivos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Área de estudo e grupo amostral

Este estudo foi realizado em populações de *E. nattereri* localizadas nos estados de Goiás, Mato Grosso do Sul e São Paulo (Figura 5). Todas as áreas de coleta compreendem o bioma Cerrado, o qual ocupa uma área de aproximadamente 2 milhões de km², entre 5º e 20º de latitude Sul e 45º a 60º de longitude Oeste (Ratter *et al.*, 1998). Atualmente, 20% deste bioma permanecem inalterados e somente 1,2% está protegido (Mittermeier *et al.*, 1998). Recentemente, encontra-se entre os 25 *hotspots* terrestres mais importantes (Myers *et al.*, 2000), sendo provavelmente a savana tropical mais ameaçada do mundo (Silva & Bates, 2002). O bioma Cerrado localiza-se predominantemente no Planalto Central do Brasil e como área contínua, engloba os Estados de Goiás, Tocantins e Distrito Federal, parte dos estados da Bahia, Ceará, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Piauí, Rondônia e São Paulo. É um bioma diversificado no que se refere ao clima, solo e topografia (Klink *et al.*, 1995). O clima é tropical sub-úmido, com duas estações bem definidas, uma seca e outra chuvosa (Nimer *et al.*, 1989). Aproximadamente 86% do Cerrado recebem entre 1.000 mm e 2.000 mm de chuva por ano, apresentando temperaturas médias entre 30 a 32º C no período de chuva (Nimer *et al.*, 1989). Os habitats são bastante heterogêneos quanto à diversidade vegetal e aos recursos hídricos, o que gera uma diversidade de refúgios.

O bioma Cerrado localiza-se predominantemente no Planalto Central do Brasil e como área contínua, engloba os Estados de Goiás, Tocantins e Distrito Federal, parte dos estados da Bahia, Ceará, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso

do Sul, Minas Gerais, Piauí, Rondônia e São Paulo. É um bioma diversificado no que se refere ao clima, solo e topografia (Klink *et al.*, 1995). O clima é tropical sub-úmido, com duas estações bem definidas, uma seca e outra chuvosa (Nimer *et al.*, 1989). Aproximadamente 86% do Cerrado recebem entre 1.000 mm e 2.000 mm de chuva por ano, apresentando temperaturas médias entre 30 a 32° C no período de chuva (Nimer *et al.*, 1989). Os habitats são bastante heterogêneos quanto à diversidade vegetal e aos recursos hídricos, o que gera uma diversidade de refúgios ecológicos disponíveis para a fauna (Klink *et al.*, 1995). Habitats de fonte de água livre são especialmente importantes para as populações de anfíbios anuros, cuja reprodução e manutenção dos adultos dependem extremamente desses recursos (Cardoso *et al.*, 1989; Duellman & Trueb, 1986; Colli *et al.*, 2002).

156 espécimes de *Eupemphix nattereri* foram coletados em onze localidades do Brasil Central, durante as estações chuvosas de 2002-2004. No Bioma Cerrado, a estação chuvosa ocorre entre Outubro e Março. O número de espécimes estudado em cada município e as coordenadas geográficas das onze populações estão listadas na Tabela 1. Os espécimes, das populações de Goiás, estão depositados na Coleção Zoológica da UFG (ZUFG) e os de Chapadão do Sul (MS) e Rio Claro (SP), encontram-se depositados na Coleção Zoológica da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul e na coleção zoológica C.F.B.Haddad da Universidade Estadual de São Paulo em Rio Claro, respectivamente.

Tabela 1. Caracterização das onze populações de *Eupemphix nattereri* do Brasil Central

População	Município	Número de indivíduos	Latitude	Longitude
1	Mambaí	20	14° 29' 16''	46° 06' 47''
2	Rio Claro	11	22° 24' 41''	47° 33' 41''
3	Morrinhos	22	17° 43' 54''	49° 06' 03''
4	Aporé	13	18° 57' 55''	51° 55' 35''
5	Chapadão do Sul	13	18° 47' 39''	52° 37' 22''
6	Palmeiras	10	16° 48' 18''	49° 55' 33''
7	Cristianópolis	13	17° 11' 96''	48° 42' 14''
8	Alto Paraíso	21	14° 07' 57''	47° 30' 36''
9	Quirinópolis	13	18° 26' 54''	50° 27' 06''
10	Cocalzinho	12	15° 47' 40''	48° 46' 33''
11	Goiás	08	15° 56' 04''	50° 08' 25''
Total		156		

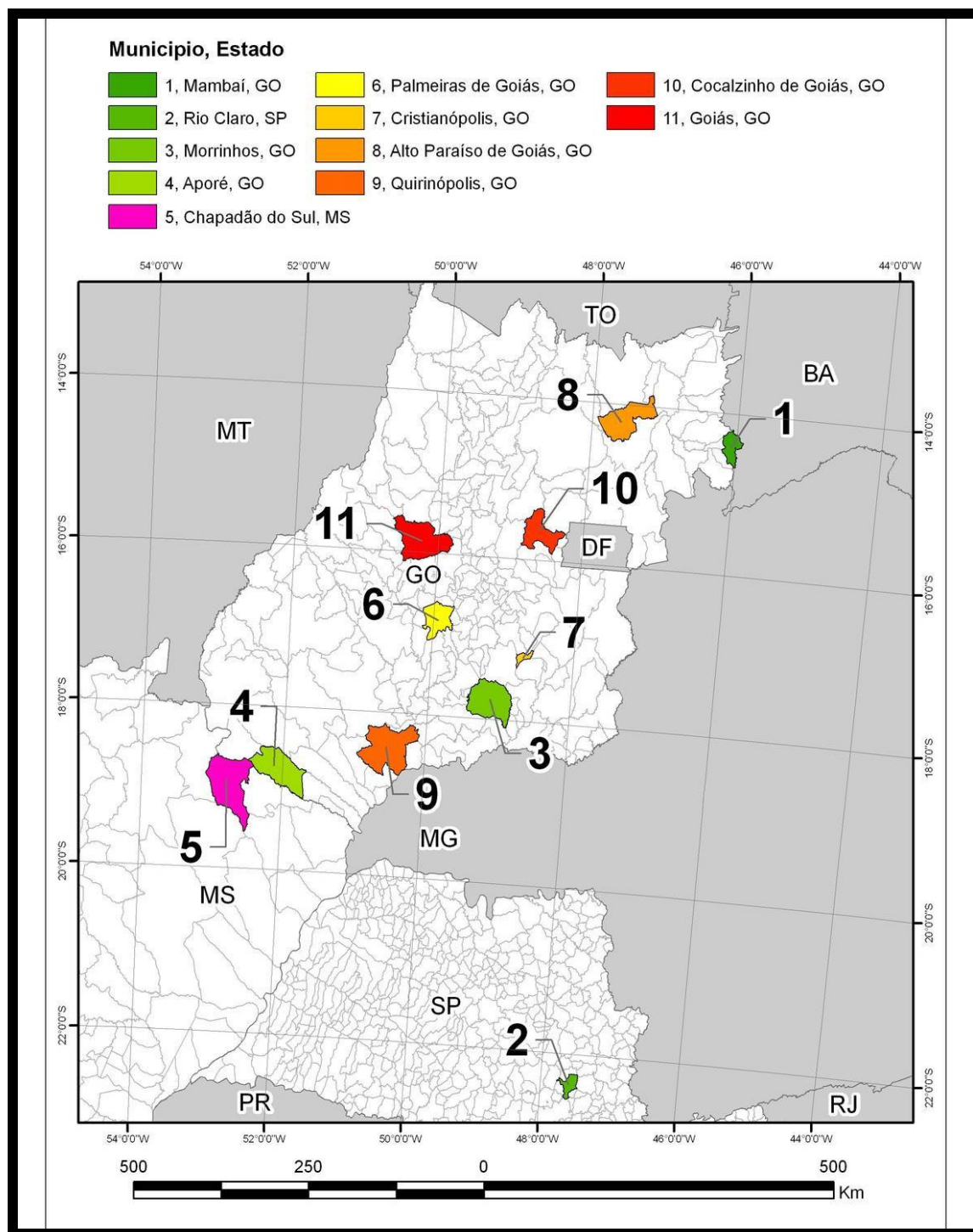


Figura 5. Mapa das 11 localidades de coleta de *E. nattereri* do Brasil Central.

4.2 Análise de RAPD

4.2.1 Extração e quantificação das amostras de DNA

Os fígados de cada espécime foram congelados a -20°C até a análise. O DNA genômico foi purificado a partir de 20mg de tecido congelado pela utilização de um kit comercial de extração de DNA (*Wizard Genomic DNA Purification Kit*, Promega Corporation, EUA), de acordo com instruções do fabricante. A quantificação da concentração de DNA existente em cada amostra foi realizada por análise comparativa em géis de agarose a 1%, corados com brometo de etídio ($10\mu\text{g/ml}$) com o *ladder Low DNA Mass* (Invitrogen, EUA). As soluções de DNA foram diluídas em água mili-Q para uma concentração final de $3\text{ ng}/\mu\text{l}$, conforme sugerido por Ferreira e Grattapaglia (1998).

4.2.2 Teste e seleção de oligonucleotídeos de RAPD

Foram testados 40 oligonucleotídeos de RAPD (Tabela 2) escolhidos de maneira aleatória nos *Kits* OPA, OPB, OPC, OPD e OPH da *Operon Technologies*, a fim de se escolher os melhores padrões de amplificação. Oito destes oligonucleotídeos foram utilizados para se analisar o polimorfismo entre e dentro das populações. A seleção das bandas para inclusão dos dados foi baseada na reprodutibilidade, clareza, intensidade da banda e resolução. A reprodutibilidade da banda foi confirmada por duas corridas adicionais contendo pelo menos dois indivíduos de cada população. As bandas sem reprodutibilidade e não distinguíveis foram excluídas da análise.

Tabela 2. Seqüências dos 40 oligonucleotídeos de RAPD

<i>Oligonucleotídeos</i>	Seqüência nucleotídea 5'→3'	<i>Oligonucleotíde os</i>	Seqüência nucleotídea 5'→3'
OPB-01	GTTTCGCTCC	OPB-14	TCCGCTCTGG
OPB-02	TGATCCCTGG	OPB-15	GGAGGGTGTT
OPB-03	CATCCCCCTG	OPB-16	TTTGCCCGGA
OPB-04	GGA CTGGAGT	OPB-17	AGGGAACGAG
OPB-05	TGCGCCCTTC	OPB-19	ACCCCCGAAG
OPB-07	GGTGACGCAG	OPB-20	GGACCCTTAC
OPB-08	GTCCACACGG	OPA-07	GAAACGGGTG
OPB-09	TGGGGGACTC	OPA-01	GGTGCGGGAA
OPB-10	CTGCTGGGAC	OPA-02	GTTTCGCTCC
OPB-11	GTAGACCCGT	OPA-03	GTAGACCCGT
OPB-12	CCTTGACGCA	OPA-04	AAGAGCCCGT
OPB-13	TTCCCCGCT	OPA-05	AACGCGCAAC
OPB-14	TCCGCTCTGG	OPA-06	CCCGTCAGCA
OPC-05	GTGGGCTGAC	OPA-09	GGGTAACGCC
OPC-10	GCGCCTGGAG	OPA-13	CAGCACCCAC
OPD-02	CGACGCCCTG	OPA-20	GTTGCGATCC
OPD-03	GCCTCGAGGG	OPC-05	GATGACCGCC
OPH-01	GCGCCTGGAG	OPC-08	TGGACCGGTG
OPH-02	AACGGGCAGG	OPC-20	ACTTCGCCAC
OPH-04	GGAAGTCGCC	OPH-05	AGTCGTCCCC

4.2.3. Reações de PCR

As reações de amplificação foram realizadas em um total de 20µl de solução contendo 2,5 ng de DNA, tampão de enzima livre de magnésio 1x, 2mM de cloreto de magnésio, 0,26 mM de cada dNTP, 10 ng de oligonucleotídeos de seqüência única e 0,5 U de Taq DNA polimerase. O termociclador 9600 (Perkin Elmer, EUA) foi utilizado nas reações de amplificação, sendo programado para realizar as seguintes condições de ciclagem: desnaturação inicial a 96°C por 3 min,

seguida por 40 ciclos de 1 min a 92°C, 1 min a 35°C e 1 min a 72°C, com uma extensão final de 3 min a 72°C. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em géis de agarose a 1,5% a 10V/cm por 3-4 horas. O DNA foi corado com brometo de etídio (10µg/ml).

4.2.4 Seleção de bandas para a construção de matrizes binárias

Os indivíduos foram genotipados para oito oligonucleotídeos (ver resultados) quanto à presença (1) e ausência (0) de bandas, gerando duas matrizes binárias. A primeira matriz binária foi denominada de matriz completa, uma vez que continha bandas de intensidades fracas, médias e fortes (Figura 6). Esta matriz foi obtida pela análise manual dos géis. A segunda matriz foi designada de matriz parcial, uma vez que possuía apenas bandas de intensidades médias e fortes. Desta forma, bandas fracas foram excluídas das análises, quando apresentavam picos de intensidade menores do que 20 pixels (ver resultados). Para a confecção desta matriz parcial foi utilizado o programa *Image Master TotalLab 1D* versão 3.01 (Amersham Pharmacia, EUA) acoplado ao sistema de vídeo fotodocumentação (VDS) que apresenta um transiluminador e uma máquina fotográfica internos.

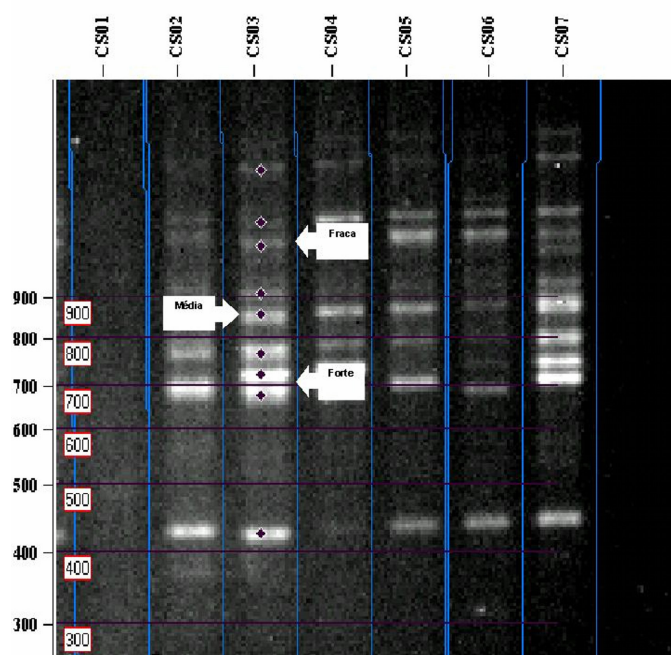


Figura 6. Padrão de amplificação do marcador OPA13 em 07 espécimes de *E.nattereri* do município de Cristianópolis (CS). As intensidades dos locos podem ser visualizadas pelas setas. Os números de 300 a 900 referem-se ao peso molecular dos alelos, em pares de base, sendo analisados por comparações com o marcador de 100 pares de base (Promega Corporation, EUA).

O recurso computacional do *software Image Master TotalLab* (Amersham Pharmacia, EUA) foi aplicado previamente à análise e interpretação do perfil eletroforético após corrida em campo elétrico uniforme. Este *software* é um programa designado para análise de géis, contendo as seguintes ferramentas: definição das canaletas, remoção de ruído de fundo, detecção das bandas, calibração do marcador de peso molecular e normalização da intensidade das bandas. O esquema abaixo ilustra de forma detalhada o funcionamento deste programa e como as bandas de intensidade fraca foram excluídas das análises.

Primeiramente, o gel a ser analisado deve ser selecionado conforme especificado na Figura 7.

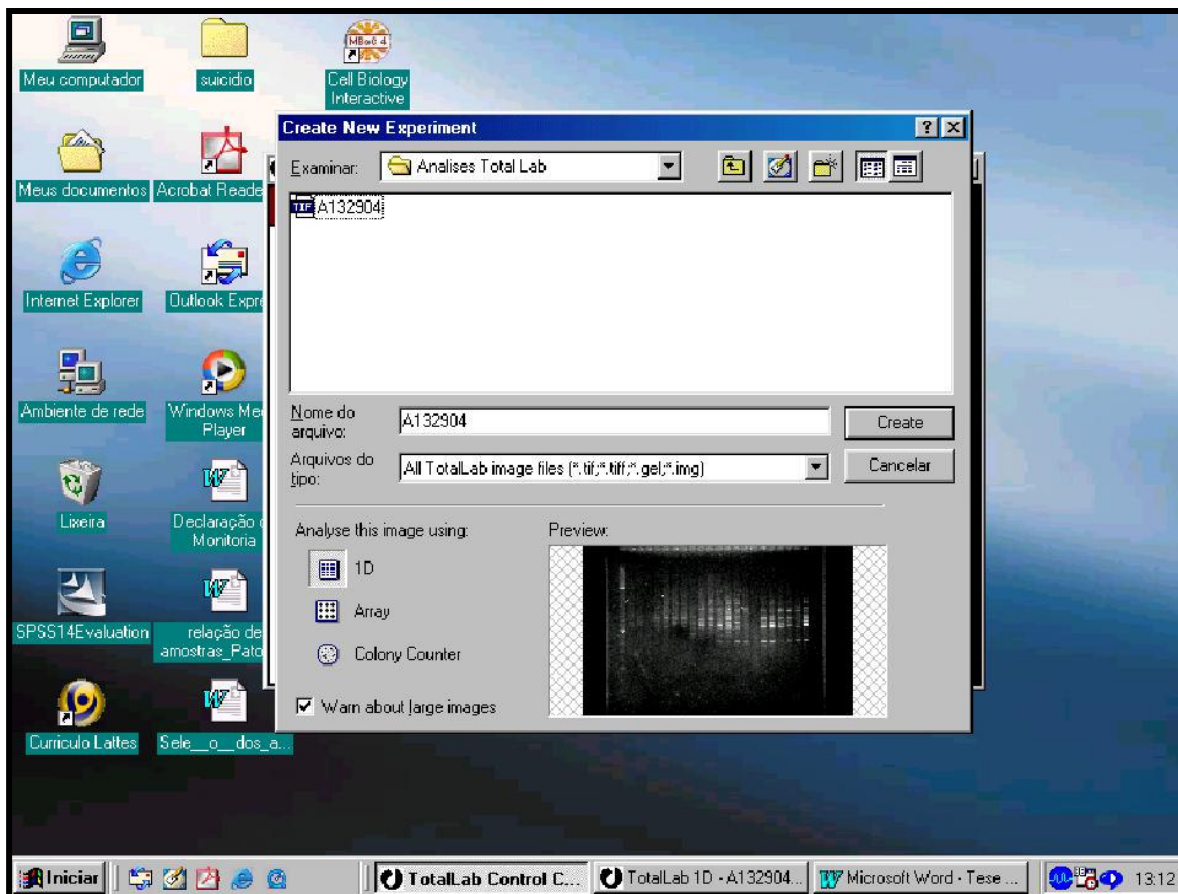


Figura 7. Seleção do gel A132904, analisado no programa Total Lab 1D.

Ao se iniciar as análises, deve-se selecionar, da barra de ferramentas do programa, a opção de se verificar o gel automaticamente ou manualmente. Para as análises aqui apresentadas a opção manual foi escolhida, realizando passo a passo cada uma das cinco ferramentas do programa citadas anteriormente. A Figura 8 demonstra o gel analisado, assim como os cinco parâmetros utilizados para as análises.

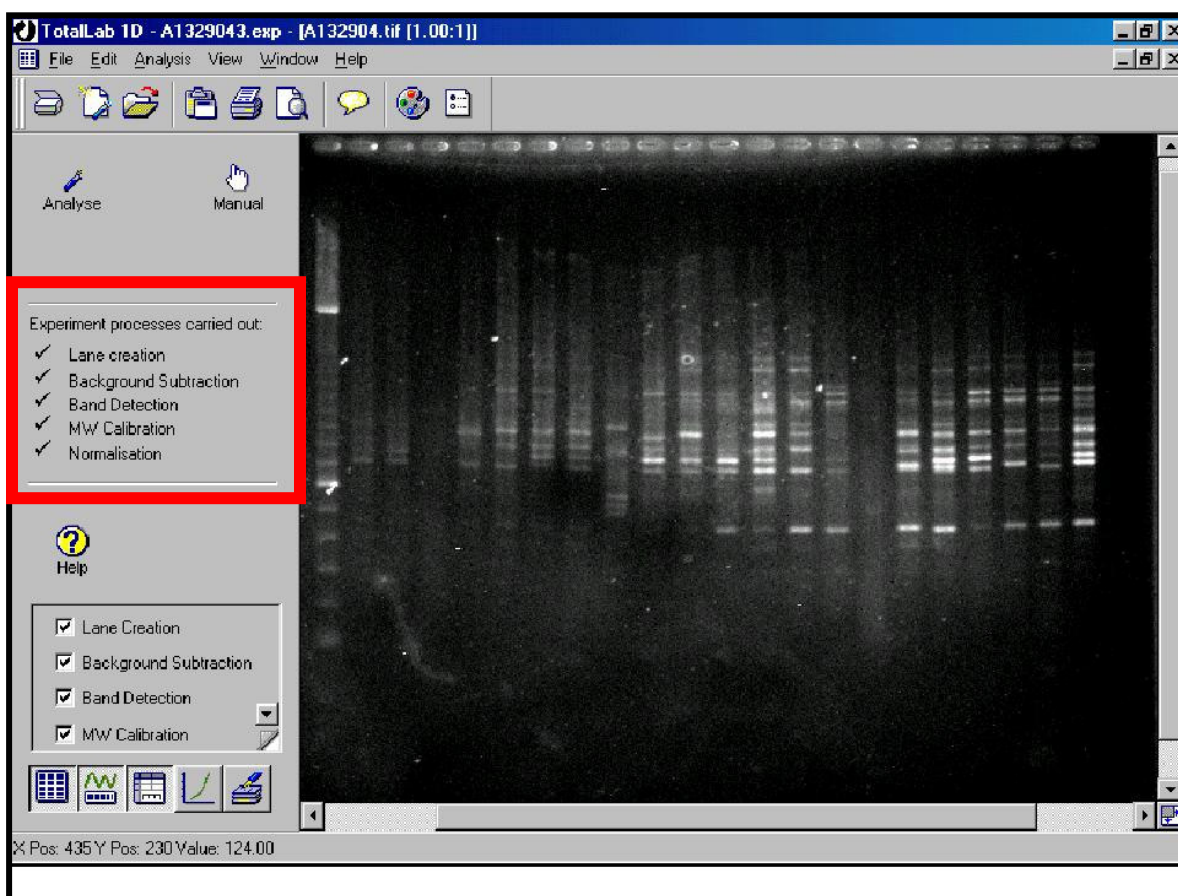


Figura 8. Gel selecionado para análise: A132904 referente ao marcador OPA13. Os cinco parâmetros utilizados nas análises podem ser evidenciados no lado esquerdo da figura, destacados em vermelho.

Após a seleção do gel, o primeiro parâmetro, caracterizado pelo programa como definição das canaletas (do inglês, *Lane creation*) foi utilizado para definir as posições e áreas das canaletas no gel e na imagem criada (Figura 9). Uma vez as posições das canaletas e das áreas ocupadas pelas amostras sejam conhecidas, operações posteriores, tais como a detecção de bandas e calibração do peso molecular podem ser efetuadas. Após a criação das canaletas, o programa permitiu a correção dos tamanhos e das formas das mesmas. Quando ocorreu a definição

das canaletas, estas foram identificadas por número e pela localidade do espécime analisado, conforme especificado na Figura 9.

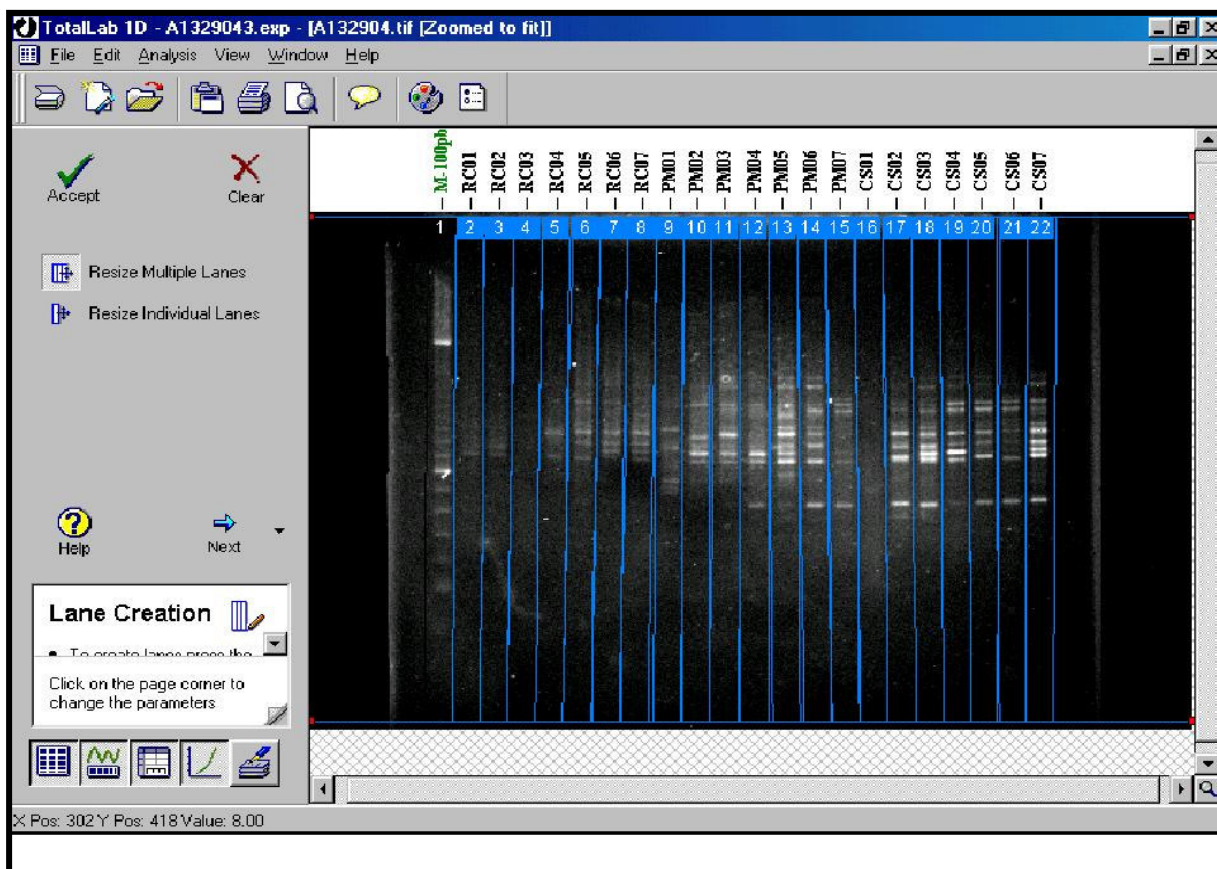


Figura 9. Identificação e caracterização das 22 canaletas do gel A132904. Os códigos em preto acima dos poços se referem aos espécimes analisados e os números de 1 a 7 à quantidade de indivíduos por localidade, neste gel. RC: Rio Claro; PM: Palmeiras; CS: Cristianópolis. O primeiro poço (em verde) refere-se ao marcador de peso molecular de

O segundo parâmetro realizado nas análises foi a remoção de ruído de fundo do gel. Para corrigir a perturbação na intensidade e contraste de bandas eletroforéticas foi realizada a subtração automática dos ruídos de fundo dos géis corados com brometo de etídio. Este ruído de fundo deve ser removido das análises, propiciando que o programa verifique apenas as bandas, desconsiderando o material presente no gel, em cada canaleta, como por exemplo, o excesso de

brometo de etídio. Vários métodos de remoção de ruído de fundo podem ser selecionados como: o *Rubber band*, o Perfil mínimo e o *Rolling Disc*. O método automático selecionado para a remoção dos ruídos de fundo foi o *Rolling Disc*. (Figura 10). Os dois primeiros métodos não foram utilizados porque são inadequados para análises de marcadores do tipo RAPD, de acordo com as recomendações do fabricante. O *Rolling Disc*, traduzido como “disco rolante” possibilita a remoção do ruído de fundo como se um disco estivesse rolando em torno dos perfis alélicos. Este método requer a especificação de um raio para que haja a correção do contraste das bandas eletroforéticas, desta forma, em todas as análises, foi utilizado um raio de 50, conforme sugerido pelo fabricante.

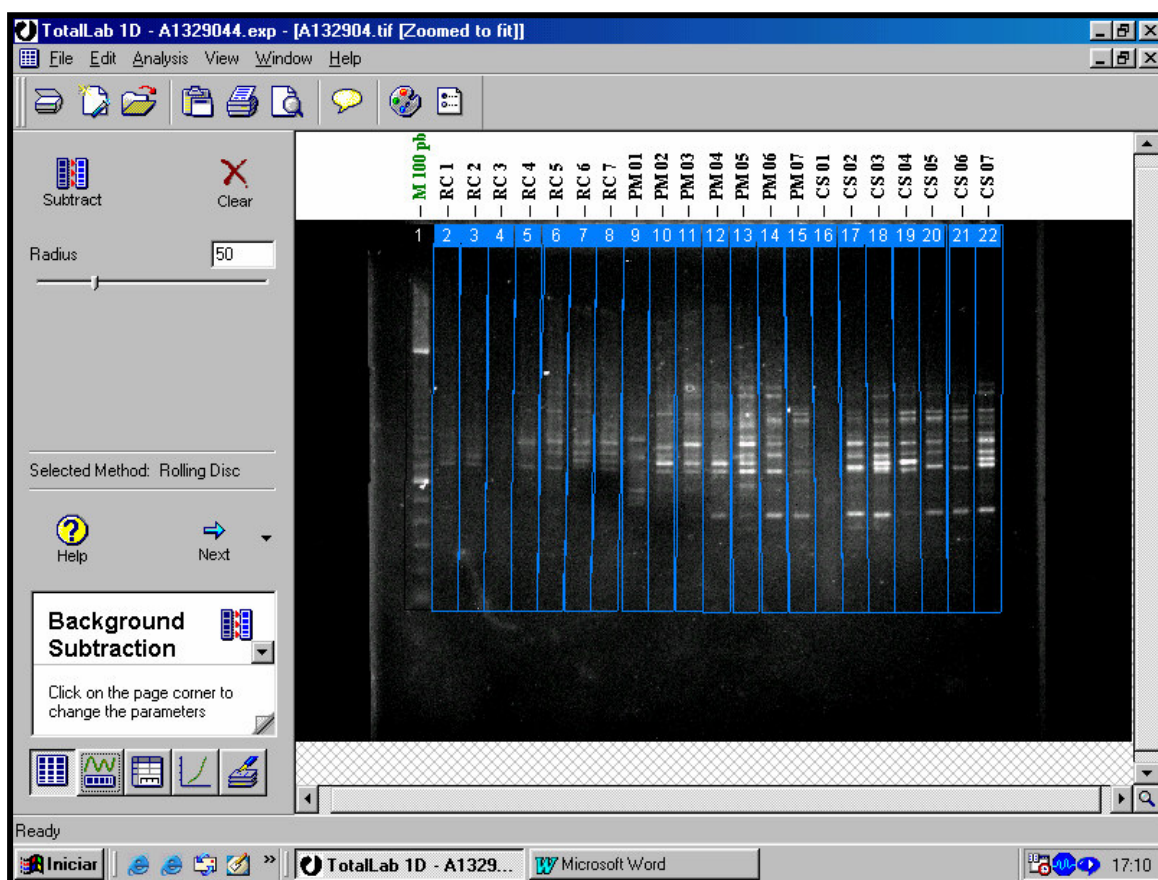


Figura 10. Remoção do ruído de fundo do gel através do método *rolling disc*, especificando o raio utilizado (50).

O próximo parâmetro analisado foi a detecção de bandas, as quais foram verificadas automaticamente e editadas manualmente. Após o reconhecimento das bandas pelo programa, todas as detecções foram avaliadas manualmente. Artefatos e bandas com intensidades fracas foram descartados das análises (Figura 11).

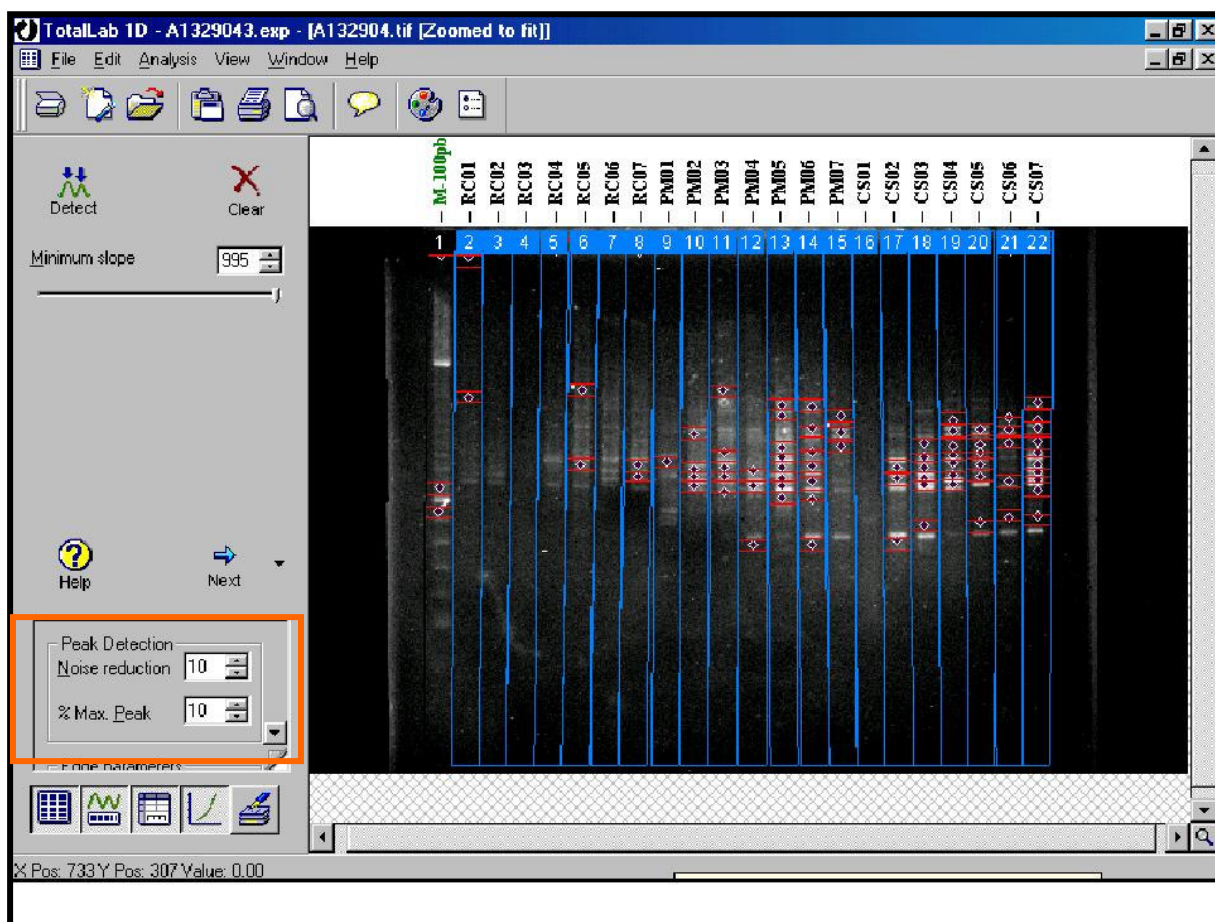


Figura 11. Detecção das bandas para análise. Os locos seleccionados estão marcados em vermelho

Há dois propósitos para a detecção das bandas: detecção dos picos de cada loco e detecção dos limites dos locos. O pico de uma dada banda é o ponto em seu perfil alélico no qual a intensidade da imagem está em seu valor máximo. Este parâmetro foi utilizado para a exclusão dos locos de intensidade fraca, uma

vez que bandas fracas apresentam picos de intensidade menores do que 20 pixels, conforme especificado posteriormente nos resultados. Além disto, estes dois parâmetros definem a posição da banda ao longo da canaleta, propiciando a medida do volume da banda. Os limites de cada banda estão localizados em ambos os lados do pico de cada loco.

Como relatado anteriormente, as bandas são detectadas automaticamente pelo programa e por esta detecção uma série de algoritmos é calculada para se verificar os picos de cada banda/canaleta no gel, assim como os limites da banda. Apesar de este método ser classificado como automático, há a necessidade de que alguns parâmetros sejam especificados. Estas variáveis são classificadas pelo programa como: inclinação mínima do pico, redução do ruído e porcentagem máxima do pico. Cada vez que estes parâmetros são modificados, o padrão de detecção das bandas também sofre mudanças.

Inclinação mínima (variação de 0 a 999): Esta variável representa a intensidade da banda em relação à área circundante. Um alto valor significa que a transição entre o ruído de fundo referente à canaleta, e a intensidade da banda deve ser pronunciada. Um valor mais baixo permite que tal gradiente seja mais brando. Em geral, quanto mais baixos os valores da inclinação, mais bandas são detectadas. Para as análises realizadas neste trabalho, o valor de 993 foi utilizado (Figura 12). Posteriormente, as bandas de intensidade fraca foram retiradas manualmente.

Redução do ruído (variação de 0 a 20): Seleciona quais bandas devem ser ignoradas das análises, sendo utilizada para eliminar ruídos nas imagens. Em geral, quanto maior o valor desta variável, menos bandas ou picos são detectados. Nas

análises, para eliminar as bandas de intensidade fraca, foi utilizado o valor máximo (20) (Figura 12).

Porcentagem máxima do pico (0-100): Este é um parâmetro que descarta o menor pico de intensidade da banda, ou seja, os locos de intensidade fraca. Entretanto, quando valores mais altos do que 10% eram utilizados nas análises, locos de intensidade média, também eram descartados. Por isso, 10 foi o valor selecionado, propiciando o descarte das bandas fracas. (Figura 12).

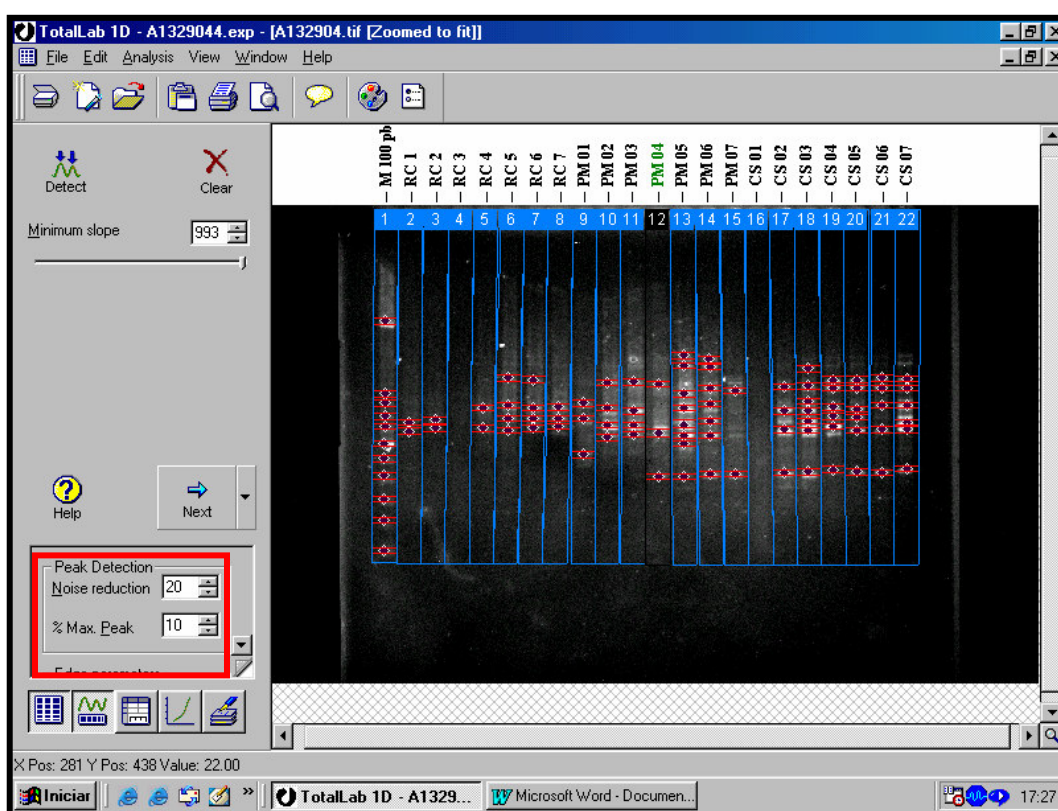


Figura 12. As três variáveis utilizadas para detecção das bandas, de cima para baixo, no lado esquerdo da figura: inclinação mínima (do inglês, *Minimum slope*) com valor de 993, redução do ruído (do inglês, *noise reduction*) de 20 e porcentagem máxima do pico (do inglês, *% Max. Peak*) de 10%.

O quarto parâmetro utilizado nas análises foi a calibração do marcador de peso molecular. Por esta ferramenta, o programa estabeleceu o peso molecular das bandas nas canaletas dos géis. Dados os valores das bandas detectadas em cada

canaleta, o *software* pode interpolar ou extrapolar graficamente as bandas de peso molecular conhecidas ao longo do gel. Uma vez determinados os contornos de cada banda, o programa pode utilizar uma curva baseada em algoritmos para se determinar a relação entre peso molecular e a posição das bandas ao longo do gel (ver resultados). Assim, podem ser encontrados o peso molecular de qualquer banda localizada em qualquer canaleta.

Visando realizar a calibração do marcador de peso molecular, o *software TotalLab* possui uma lista de marcadores moleculares padrões, desde 100 pares de base até 1 kilobases. Neste estudo, o marcador utilizado foi o de 100 (Promega Corporation, EUA), o qual apresenta bandas que variam de 100 em 100 pares de base, sendo a menor banda a de 100 e a maior de 1500 pares de base (Figura 13).

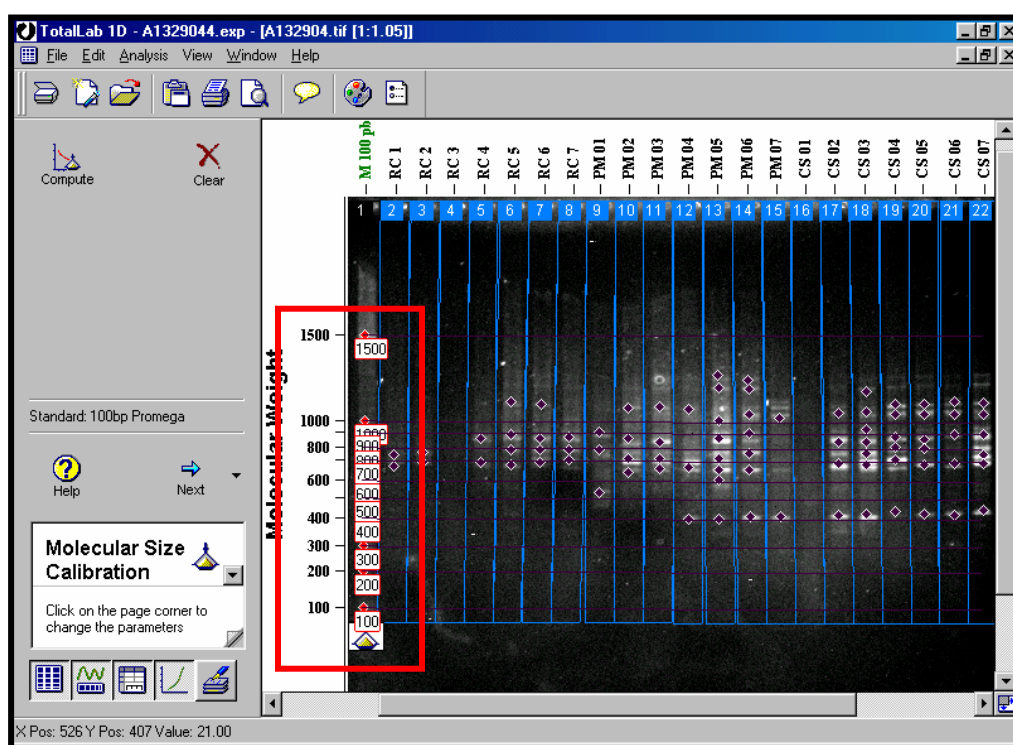


Figura 13. Calibração da primeira canaleta a qual se refere ao marcador de 100 pares de base variando de 100 a 1500 pares de base.

O último parâmetro do programa é a normalização. Esta variável pode ser utilizada para normalizar os volumes das bandas na imagem do gel, ocasionando uniformidade das condições do gel em função do viés de aplicação das amostras e de interpretação dos resultados. Isto significa a escolha de uma banda normalizada, já padronizada, como é o caso das bandas do marcador de peso molecular utilizado. Os volumes de cada banda são calculados de acordo com um volume conhecido de uma determinada banda. Desta forma, a normalização requer a seleção de uma banda ou de bandas no gel. Também é escolhido um valor para a normalização, que é conhecido em determinadas bandas. Por exemplo, a banda de 1500 pares de base do marcador de peso molecular (em verde, na Figura 14) foi selecionada para normalizar as demais, uma vez que de acordo com o fabricante (Promega Corporation, EUA) apresenta um volume de 100 nanogramas (Figura 14).

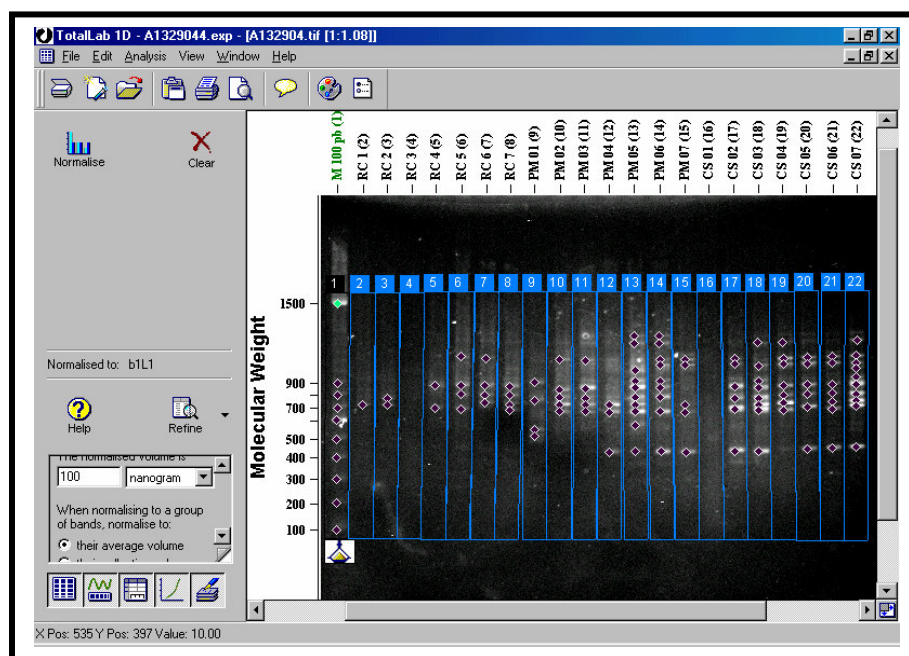


Figura 14. Normalização das bandas de acordo com o a banda de 1500 pares de base.

Após a realização de todas estas etapas, os géis foram analisados, por canaleta e por banda, uma vez que o programa determinou a posição das bandas ao longo das canaletas, parâmetro caracterizado como Rf. Este caracteriza as bandas maiores, ou seja, as bandas mais próximas do local de aplicação de amostras, de 0 e as menores, ou seja, as que apresentam um padrão eletroforético mais rápido, com valores próximos de 1. Desta forma, o programa *TotalLab Image Master 1D* detectou as bandas, suas intensidades (em pixel), assim como o peso molecular das bandas que foram detectadas nas análises. O programa possibilitou uma uniformidade das análises de todos os géis, quanto à interpretação dos resultados, obtidos após as corridas eletroforéticas, em campos elétricos uniformes (10 V/cm).

4.3. Estimativa de Frequências Alélicas e Parâmetros Genéticos Básicos

Como mencionado anteriormente, a partir da leitura dos géis gerou-se uma matriz binária em que os indivíduos foram genotipados quanto à presença (1) ou ausência (0) de bandas. Com esta matriz, calculou-se a porcentagem de polimorfismo obtido com cada oligonucleotídeo utilizado pela fórmula:

$$P = \frac{nbp}{nbt}$$

Onde:

P= porcentagem de polimorfismo (ou taxa de polimorfismo)

nbp= número de bandas polimórficas

nbt= número total de bandas

Além disso, as freqüências alélicas foram estimadas, com base na metodologia proposta por Lynch & Milligan (1994). Esta metodologia foi desenvolvida para estimar parâmetros populacionais obtidos a partir de marcadores RAPD, a partir de dois pressupostos: 1) cada banda identificada pode estar associada a um loco com dois alelos, uma vez que o caráter “dominante” do marcador impede a distinção entre os genótipos heterozigoto e homozigoto “dominante”; 2) assumir o equilíbrio de Hardy-Weinberg. A partir desses dois parâmetros, a freqüência do alelo “nulo” q , pode ser estimada por:

$$q = x^{1/2} \left(1 - \frac{\text{Var}(x)}{8x^2} \right)^{-1},$$

onde x é a proporção dos N indivíduos analisados na população que não apresentam banda para os locos, sendo $\text{Var}(x) = x(1-x)/N$. Essa correção minimiza os vies na estimativa de “ q ” devido a tamanhos amostrais pequenos, podendo ser grande se o alelo for raro ($x, 0, 1$) (Telles, 2005).

4.4. Estrutura Genética Populacional

Neste estudo, conforme relatado anteriormente, foram obtidas duas matrizes binárias que foram comparadas com base em três metodologias diferentes, a fim de selecionar uma, para se avaliar a estrutura genética das 11 populações de *Eupemphix nattereri*. A primeira metodologia foi a Análise de Variância de freqüências alélicas proposta por Cockerham (1969) que parte da pressuposição de que as populações são originadas de uma população ancestral, permitindo assim a estimativa de divergência genética entre populações ou o coeficiente de parentesco entre dois indivíduos dentro de populações (θ_P). Para

essa análise, parte-se do pressuposto de que as populações estão em equilíbrio, para se calcular as freqüências alélicas com base nas bandas de RAPD, ou, além disso, utiliza-se a correção de Lynch e Milligan (1994).

A distribuição da variabilidade genética entre e dentro das populações foi caracterizada considerando o efeito do modelo (i.e., diferentes localidades) como aleatório. Assim, de acordo com Weir (1996), a variável x_{ij} corresponde ao alelo j na população i , portanto, quando x_{ij} estava presente, recebeu o valor 1 e quando estava ausente recebeu o valor zero. A análise de variância das freqüências alélicas foi realizada com base no modelo estatístico:

$$Y_{ikl} = m + p_i + b_{k(i)} + g_{l(ik)}$$

em que, Y_{ikl} : freqüência do gene l , dentro do indivíduo k , dentro da população i ; m média geral da freqüência alélica; p_i : efeito da população i , com $i = 1, 2, \dots, a$; $b_{k(i)}$: efeito do indivíduo k , dentro da população i , com $k = 1, 2, \dots, b_i$; $g_{l(ik)}$: efeito do gene l , dentro do indivíduo k , dentro da população i , com $l = 1, 2, \dots, n_{ik}$. O parâmetro estimado foi o θ_p que determina o grau de divergência genética entre populações. Para verificar se as estimativas médias de θ_p são estatisticamente diferentes de zero, estimou-se o intervalo de confiança a 95% de probabilidade pelo método de reamostragem *bootstrap*. Se os intervalos de confiança incluírem o valor zero, isso indica que não há estruturação da variabilidade genética no nível hierárquico testado. O procedimento *bootstrap* consiste em reamostrar os locos da matriz de dados genéticos, com reposição e recalculando todas as estatísticas desejadas. No presente estudo foram utilizadas 1000 repetições.

A segunda metodologia utilizada para avaliar a divergência entre as populações foi a Análise de Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992). A

AMOVA produz estimativas dos componentes de variância análogas às estatísticas F , que os autores chamaram de estatísticas Φ , que refletem a correlação da diversidade dos haplótipos em diferentes níveis de subdivisão hierárquica. Para o desenvolvimento da AMOVA, os autores basearam-se, primeiramente, na idéia de que quando uma espécie exibe subdivisão em demes, espera-se um aumento da diversidade haplotípica e um aumento do polimorfismo entre genomas amostrados em diferentes demes, de acordo com Slatkin (1987). E segundo Li (1976), a soma de quadrados pode ser descrita na forma de quadrados de diferenças entre todos os pares de observação. Excoffier *et al.* (1992) estudaram dez populações humanas, para as quais amplos conjuntos de dados estão disponíveis na literatura. Estas populações representaram cinco grupos regionais, contendo duas populações cada.

Para as análises com a utilização de RFLP (“Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos de Restrição”), com os quais construíram uma análise de variância molecular hierárquica, partindo diretamente da matriz das distâncias quadradas de todos os pares de haplótipos. Os diferentes níveis hierárquicos apresentam componentes de variância (σ^2) extraídos a partir dos quadrados médios (QMs) em relação ao esperado. Exemplificando, os dois níveis de hierarquia utilizados neste estudo, entre e dentro de populações, podem ser considerados. Assim, verifica-se na Tabela 3 que:

Tabela 3. Esquema de Análise de Variância Molecular (AMOVA)

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	E(QM)
Entre populações	P-1	SQ	QM	$\sigma_b^2 + 2$
Dentro de populações	N-P	SQ _b	QM _b	σ_b^2
TOTAL	N-1	S _T		

$$\sigma^2 = \sigma_a^2 / \sigma^2$$

P= número total de populações, N= número total de dados genotípicos ou número total de genes para cada haplótipo

Os componentes de variância em cada nível de hierarquia são extraídos das esperanças dos quadrados médios e no caso o valor de $\Phi_{ST} = \sigma_a^2 / \sigma^2$, onde: Φ_{ST} = a proporção da variabilidade molecular de haplótipos entre populações. Para obter uma distribuição nula dessas estatísticas, foram utilizados procedimentos de aleatorização, por permutações randômicas das linhas e colunas correspondentes da matriz de distâncias quadráticas. Os componentes de variância foram estimados para cada uma das matrizes utilizando cerca de 1000 permutações.

A AMOVA constitui uma estrutura coerente e flexível para a análise de dados moleculares (Excoffier *et al.*, 1992). Apesar de não originalmente desenvolvida para a análise de dados gerados por RAPD, a AMOVA tem se mostrado eficiente, com habilidade para testar a significância estatística de dados hierárquicos não demonstrada até então por outros tipos de análise (Tansley & Brown, 2000).

A terceira metodologia utilizada para estimar a divergência entre populações é baseada na inferência Bayesiana, proposta por Holsinger *et al* (2002) utilizando o programa HICKORY v 1.0 (Holsinger & Lewis, 2003). Na notação proposta por Holsinger (1999) e Holsinger *et al.* (2002), análoga à estatística F proposta por Weir & Cockherham (1983), o *f* se refere ao F_{IS} e o θ_B ao F_{ST} . Para marcadores dominantes, a distribuição condicional total dos parâmetros é dada por:

$$P(f, p, \pi / N_{A1} N_{A2}) \propto \prod_{I=1}^I \prod_{K=1}^K \left[\prod_{i=1}^I \left(\prod_{k=1}^K Y_{A1,ik}^N Y_{A2,ik}^N P(Y_{ik} / \pi_i, \theta, f) \right) P(\pi_i) \right] P(\theta) P(f)$$

$P(f)$ e $P(\theta)$: distribuição *a priori* de f e θ ;

$N_{A1, ik}$, $N_{A2, ik}$: número de fenótipos dominantes e recessivos no loco i da população k ;

$P(\pi_i)$: distribuição *a priori* da média das freqüências alélicas por loco;

$P(Y_{ik} / \pi_i, \theta, f)$: freqüência fenotípica inicial em cada população.

Para calcular $P(Y_{ik} / \pi_i, \theta, f)$ deve-se assumir que a distribuição *a priori* da freqüência dos alelos no loco i na $k^{\text{ésima}}$ população, P_{ik} é dada por uma distribuição- β com parâmetros $[(1-\theta)/\theta] \pi_i$ e $[(1-\theta)/\theta](1-\pi_i)$. A freqüência fenotípica correspondentes deve ser calculada como:

$$Y_{A1,ik} = p_{ik}^2 (1-f) + p_{ik} f + 2 p_{ik} (1-p_{ik}) (1-f)$$

$$Y_{A2,ik} = (1-p_{ik})^2 (1-f) + (1-p_{ik}) f$$

Este primeiro estágio da verossimilhança consiste de uma amostragem binomial dos fenótipos. Tais formulações assumem amostragens independentes tanto para os locos quanto para as populações. Amostragens independentes para os locos permitem ignorar qualquer dependência estatística associada a desequilíbrio gamético, apesar de se esperar que este efeito seja pequeno. Amostragens independentes sobre as populações já são mais problemáticas, pois altas correlações entre as populações podem ocorrer nos modelos genéticos devido a processos estruturados espacialmente como o fluxo gênico, principalmente

quando tanto a taxa de mutações quanto o número de populações são pequenos (Holsinger & Wallace, 2004).

Entretanto, em modelos Bayesianos hierárquicos, expressões para as distribuições *a posteriori* de f e θ^B não estão disponíveis. Desta forma, diversos métodos têm sido empregados na obtenção destas distribuições *a posteriori* (Gamerman, 1997), sendo que alguns as obtêm empiricamente, utilizando algoritmos de randomização via Cadeias de Markov, pelo método de Monte Carlo (MCMC), visando aproximar esta distribuição do f e do θ^B para qualquer tipo de dado genético (Coelho, 2002; Holsinger & Wallace, 2004).

Nesta metodologia, não se pressupõe, *a priori*, a existência de endogamia e nem do equilíbrio de Hardy-Weinberg nas populações. A distribuição *a posteriori* do estimador θ^B se aproxima numericamente da simulação realizada pela MCMC, variando entre 0 e 1. O software utilizado na análise Bayesiana, HICKORY v 1.0 permite estimar o valor de θ^B por meio de quatro modelos. O primeiro descrito como *Full model* (“Modelo completo”): estima θ^B e f . Já o segundo e o terceiro modelos assumem que θ^B e f sejam iguais a zero, respectivamente. Quanto ao quarto modelo, como a estimativa de f , baseada em marcadores dominantes, é geralmente enviesada, especialmente em amostras pequenas ($n < 10$), este modelo permite que f varie livremente. Neste caso, os valores de f são escolhidos aleatoriamente, *a priori*, enquanto outros parâmetros, como o θ^B são estimados pelo método de Monte Carlo (MCMC). Finalmente, o programa compara os resultados dos quatro modelos usando o critério designado como *Deviant Information Criterion* (DIC) (Critério de Informação sobre Desvios) (Holsinger & Wallace, 2004; Telles, 2005).

Desta forma, o valor do DIC pode ser utilizado para se decidir qual dos quatro modelos acima descritos melhor caracteriza o conjunto de dados analisados (Spiegelhalter *et al.*, 2002; Telles, 2005). O DIC avalia de forma comparativa os resultados de todos os modelos, sendo os menores valores deste parâmetro preferíveis, embora que diferenças de menos de 5 ou 6 unidades, entre os modelos, não sejam consideradas para se decidir a respeito de um dos quatro modelos. Neste caso, quando as diferenças entre os valores de DIC são desprezíveis, o parâmetro Dbar, que é uma medida de como os modelos se ajustam aos dados, pode ser escolhido e mais uma vez, quanto menores os valores deste parâmetro, melhor o modelo se ajusta aos dados.

Entretanto outros parâmetros também são estimados para auxiliar na escolha de um dos quatros modelos, como o I_e , no qual valores elevados significam mais informação extraída dos dados e o $H-d$ o qual mede a distâncias entre as simulações das distribuições *a posteriori*, sendo interpretado como a porcentagem da não-sobreposição entre tais distribuições. Se $H-d$ for zero, as distribuições são idênticas e se $H-d$ for igual a 1, as distribuições são diferentes.

4.5. Distâncias genéticas

A divergência genética entre as populações foi avaliada com base na matriz completa e nas distâncias genéticas obtidas pelas diferentes metodologias. Foram obtidas matrizes de Φ_{ST} e θ^B par a par, utilizando-se, respectivamente a AMOVA e o método Bayesiano. Com base nas frequências alélicas, assumindo-se equilíbrio e utilizando-se a correção de Lynch & Milligan (1994), foram calculadas também matrizes de distância de Nei (1978) entre as populações. Essas matrizes foram

analisadas pelo método de agrupamento do tipo UPGMA (do inglês, *Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic averages*), (Análise de Agrupamento aos Pares utilizando Médias Aritméticas) que produz um arranjo hierárquico de classificação das populações, representado por um dendograma. A correlação cofenética calculada entre as distâncias genéticas originais e as distâncias entre as populações no dendograma foi realizada para se testar a representatividade deste agrupamento.

4.6. Correlação entre distâncias genéticas e geográficas

O padrão de variação espacial das populações foi analisado usando a estimativa do coeficiente de correlação entre a matriz completa de distância genética par a par, baseada no coeficiente Φ_{ST} e a matriz de distâncias geográficas. A significância dessa correlação foi testada pela estatística z de Mantel (Manly, 1997), usando 5000 permutações aleatórias. A estatística Z apresenta uma correlação matricial com o r de Pearson, sendo de fato utilizada para testar a significância de r (Manly, 1997). O valor Z de Mantel é dado por:

$$Z = \sum_{i,j=1}^n X_{ij} Y_{ij}$$

onde X_{ij} e Y_{ij} são elementos das matrizes X e Y a serem comparados, neste caso, as matrizes de distâncias geográfica e genética, respectivamente. A significância desse valor de Z pode ser obtida comparando-se esse valor observado com valores de uma distribuição nula, recalculando-se os valores de Z diversas

vezes, aleatorizando, em cada uma delas, a ordem dos elementos da matriz (Manly, 1997).

Visando avaliar o padrão multivariado de estrutura espacial entre as populações, foram calculados coeficientes de correlação matricial entre as distâncias genéticas e duas matrizes binárias de conexão geográficas, ligando populações localizadas a menos de 100 km e a menos de 50 km. Para a construção destas matrizes foram utilizados os valores 0 e 1, este último indicando pares de populações separadas por distâncias menores do que 100 km ou 50 km. A significância desta correlação também foi estabelecida utilizando o teste de Mantel.

4.7. Análise de descontinuidade genética

Para acessar a descontinuidade dos dados genéticos no espaço geográfico (Epperson, 2003; Telles, 2005), foi utilizada a conectividade de Gabriel (Gabriel & Sokal, 1969). Para esta análise de descontinuidade, as populações são inicialmente localizadas em um mapa de acordo com suas coordenadas geográficas (latitude e longitude) e o método de conectividade de Gabriel é utilizado para acoplá-las, resultando em uma rede de conexão entre as populações. No espaço geográfico, esta rede é formada acoplando conjuntos de duas populações (A e B), sendo que a ligação entre elas só ocorre, se e somente se, um círculo passando sobre elas não incluir nenhuma outra população. Desta forma, a conectividade de Gabriel obedece a uma condição designada como “planaridade”, ou seja, não podem ocorrer sobreposições entre as regiões geográficas definidas pelas conexões (Epperson, 2003).

Uma maneira de se avaliar discontinuidades em dados multivariados é simplesmente dividir as distâncias genéticas entre as populações (A e B) na rede de Gabriel pela distância geográfica. Dessa forma, obtêm-se uma razão que expressa se as distâncias genéticas seriam altas ou baixas em função das distâncias geográficas. A análise de discontinuidade é feita mapeando-se uma proporção de 25% dos valores mais elevados da distribuição global dessas razões ao longo da conectividade de Gabriel (Legendre & Legendre, 1998; Telles, 2005).

4.8. Análises morfométricas

Para as análises morfométricas, das 11 populações amostradas apenas 9 foram utilizadas, sendo excluídas as populações de Rio Claro (SP) e Chapadão do Sul (MS), uma vez que não foi possível efetuar a morfometria dos indivíduos. Desta forma, foram medidos 132 espécimes adultos de *E. nattereri* procedentes dos municípios do Estado de Goiás listados na Tabela 1. Os espécimes foram medidos com paquímetro de precisão (0,05mm). Cada característica morfológica foi logaritmizada para realizar as análises estatísticas paramétricas. Na figura 15 são observadas as medidas descritas na Tabela 4.

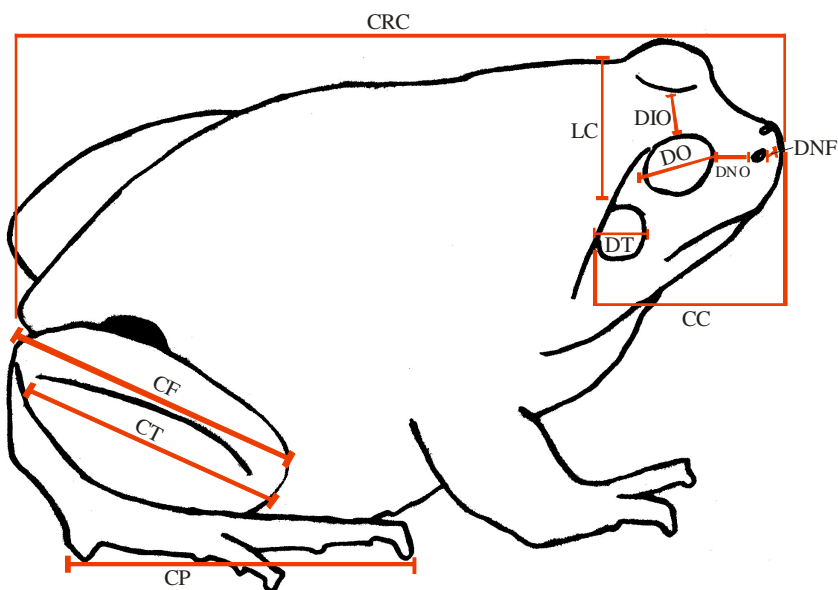


Figura 15. Esquema de *Eupemphix nattereri* demonstrando as 11 medidas realizadas, listadas na tabela 4.

Tabela 4. Medidas morfométricas realizadas para os 132 espécimes de *E. nattereri*.

Medida	Abreviatura	Descrição
Comprimento rostro-cloacal	CRC	Do ápice do focinho ao ápice terminal da cloaca.
Comprimento do fêmur	CF	Da região sacral à articulação com a patela.
Largura da Cabeça	LC	Entre os bordos posteriores dos pavilhões auditivos
Distância intraorbital	DIO	Entre as duas órbitas oculares.
Distância narina-olho	DNO	Da borda anterior do globo ocular direito à borda posterior da narina direita.
Distância narina-focinho	DNF	Da borda anterior da narina ao ápice central do focinho.
Comprimento do pé	CP	Do calo calcâneo do pé direito ao ápice do quarto artelho.
Comprimento da tíbia	CT	Da extremidade proximal da tíbia direita ao ápice do quarto artelho.
Comprimento da cabeça	CC	Das primeiras vértebras da região cervical ao ápice central do focinho.
Diâmetro do olho	DO	Da borda anterior à bordo posterior do globo ocular.
Diâmetro do tímpano	DT	Da borda posterior à borda anterior do tímpano direito.

Para determinar os parâmetros biométricos que mais contribuíram para a variação morfológica das nove populações amostradas e o grau de diferenciação morfológica entre e dentro das populações foram realizadas análises de variância (ANOVA) (Sokal & Rohlf, 1995). Os componentes de variância da ANOVA modelo II permitiram estabelecer a proporção de variação entre e dentro das populações locais, para cada um dos caracteres. Uma análise de variância multidimensional (MANOVA) permite avaliar a divergência entre as populações com base em todas as características ao mesmo tempo, utilizando-se a estatística de Wilks.

O padrão de discriminação morfométrico entre as populações foi examinado por meio da análise de variáveis canônicas (AVC), ou análise discriminante múltipla (Neff & Marcus, 1980). Esta é uma técnica para redução de dimensão, relacionada à análise de componentes principais e correlação canônica. As variáveis canônicas são combinações lineares das variáveis quantitativas, as quais sumarizam a principal direção de variação entre os grupos analisados, ou seja, entre as populações locais. As medidas dos 11 caracteres biométricos foram logaritmizadas e os autovalores e autovetores extraídos a partir do produto das matrizes de variância-covariância entre e dentro das populações (Neff & Marcus, 1980). Os escores dos indivíduos foram projetados no espaço reduzido dos eixos canônicos, permitindo determinar, através de um gráfico de dispersão, os padrões de diferenciação entre as populações analisadas.

Desta forma, a análise das variáveis canônicas mostra-se bastante apropriada em estudos morfométricos e de diferenciação geográfica uma vez que permite maximizar a separação entre grupos e indicar os caracteres que mais contribuem para a discriminação das populações ao longo de cada variável

canônica (Reis *et al.*, 1990). A distância ao quadrado de Mahalanobis (MDS), obtida a partir dos escores canônicos, foi utilizada para visualizar o padrão de diferenciação morfométrica entre as nove populações.

4.9. Associação do padrão espacial da variabilidade genética com dados morfométricos, microambientais e macroambientais

Nas análises de comparações matriciais entre dados genéticos, morfométricos, microambientais e macroambientais também foram analisadas nove populações, dentre as 11, listadas anteriormente. Desta forma, a matriz de distância genética obtida pela AMOVA para estas nove localidades, foi utilizada para realização de testes de Mantel, sendo comparada com matrizes que foram construídas para variáveis morfométricas, microambientais e macroambientais. As variáveis ambientais buscaram compilar características dos municípios amostrados, sendo referentes principalmente a dados climáticos. Os dados microambientais, por município, foram obtidos no momento das coletas dos espécimes e os macroambientais são provenientes do *Atlas of the Biosphere* (2002), em formato de *grid* em arquivo padrão do *ArcView*. Para este estudo, estes dados foram obtidos das células que contêm as coordenadas de cada localidade analisada. As variáveis morfométricas foram listadas anteriormente e as relacionadas aos dados ambientais estão listadas abaixo:

- Macroambientais
 - Precipitação anual total;
 - Evapotranspiração potencial;
 - Temperatura máxima anual;

- Temperatura mínima anual;
- Umidade média
- Microambientais
 - Temperatura média do ar;
 - Umidade relativa do ar;
 - Altitude

Desta forma, visando estimar as correlações matriciais dessas variáveis com as distâncias genéticas (Φ_{ST}), foram construídas matrizes de diferença par a par entre as localidades. Tais matrizes foram definidas por coeficientes de distância Euclidiana entre as localidades, após a padronização das variáveis (média=0 e variância=1) (Sneath & Sokal, 1973).

4.10. Programas computacionais utilizados nas análises

O programa TFPGA 1.3 (*Tools For Population Genetic Analyses*) (Miller, 1997) foi utilizado para calcular as estatísticas descritivas e para a análise de variância de frequências alélicas. As análises de divergência genética (UPGMA) e os testes de Mantel foram realizados utilizando o pacote NTSYS 1.5 (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*) (Rohlf, 1989). Os programas AMOVAPREP e AMOVA 1.55 (Excoffier, 1992) foram utilizados para a realização da Análise de Variância Molecular. A estatística Bayesiana foi feita utilizando-se o programa HICKORY v 1.0 (Holsinger & Lewis, 2003). As demais análises estatísticas foram realizadas com a utilização do programa SYSTAT/SYSGRAPH v 10.0 (Browne & Mels, 2000).

5. RESULTADOS

5.1. Análises dos oligonucleotídeos RAPD

Dos 40 oligonucleotídeos RAPD analisados, 08 forneceram os melhores padrões de ampliações (Tabela 5) (Figura 16). Conforme especificado anteriormente, esses *oligonucleotídeos* foram escolhidos por uma triagem preliminar, utilizando o programa *Total Lab Image Master 1D* (Amersham Pharmacia Biotech, EUA) (Figura 16). Os oito oligonucleotídeos RAPD selecionados foram os que apresentaram a melhor resolução das bandas no gel e foram utilizados na avaliação da estrutura genética das 11 populações de *E. nattereri*.

Tabela 5. Oligonucleotídeos selecionados para as análises populacionais.

Oligonucleotídeos	Seqüências 5'→3'
OPA13	CAGCACCCAC
OPB04	GGACTGGAGT
OPB06	TGCTCTGCCC
OPB07	GGTGACGCAG
OPB10	CTGCTGGGAC
OPB11	GTAGACCCGT
OPB18	CCACAGCAGT
OPC20	ACTTCGCCAC

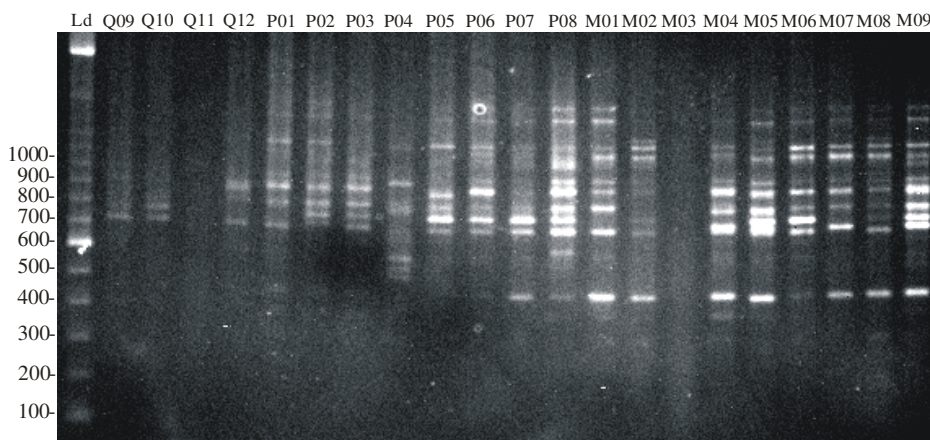


Figura 16. Padrões de amplificação do oligonucleotídeo OPA13, em espécimes de *Eupemphix nattereri*, de três localidades (Q-Quirinópolis; P-Palmeiras; MO-Morrinhos). Ld-Marcador de 100 pares de base.

Após a realização desta triagem e a partir dos resultados das amplificações dos 156 indivíduos de *Eupemphix nattereri*, com os oitos oligonucleotídeos selecionados, duas matrizes binárias foram confeccionadas. A primeira matriz binária, designada como completa, foi constituída por 82 locos, conforme especificado na tabela 6. Neste caso, os perfis alélicos de todos os indivíduos foram determinados por observações diretas nos géis, sendo realizadas manualmente, ou seja, sem o auxílio computacional. Para essa matriz, bandas de intensidades fracas, médias e fortes foram selecionados. O número de locos polimórficos por oligonucleotídeo também pode ser visualizado na tabela 6. A porcentagem de locos polimórficos foi de 98%.

Conforme descrito na tabela 6, na matriz completa, os oitos oligonucleotídeos apresentaram um mínimo de 6 e um máximo de 14 locos, fornecendo uma média de 10 locos. Para a confecção da matriz parcial, o programa *Total Lab* foi utilizado e as bandas de intensidade fraca foram excluídas das

análises, verificando o pico das mesmas durante a análise dos géis. Locos que geraram picos menores do que 20 pixels, após duas repetições, foram excluídos das análises dos dados (Figura 17).

Tabela 6. Número e percentagem de locos polimórficos por oligonucleotídeo para *E. nattereri* na matriz completa

Oligonucleotídeos	Número de locos	Locos polimórficos
OPA13	14	14
OPB04	8	7
OPB06	7	7
OPB07	13	13
OPB10	10	10
OPB11	12	12
OPB18	6	6
OPC20	12	12
Total	82	81

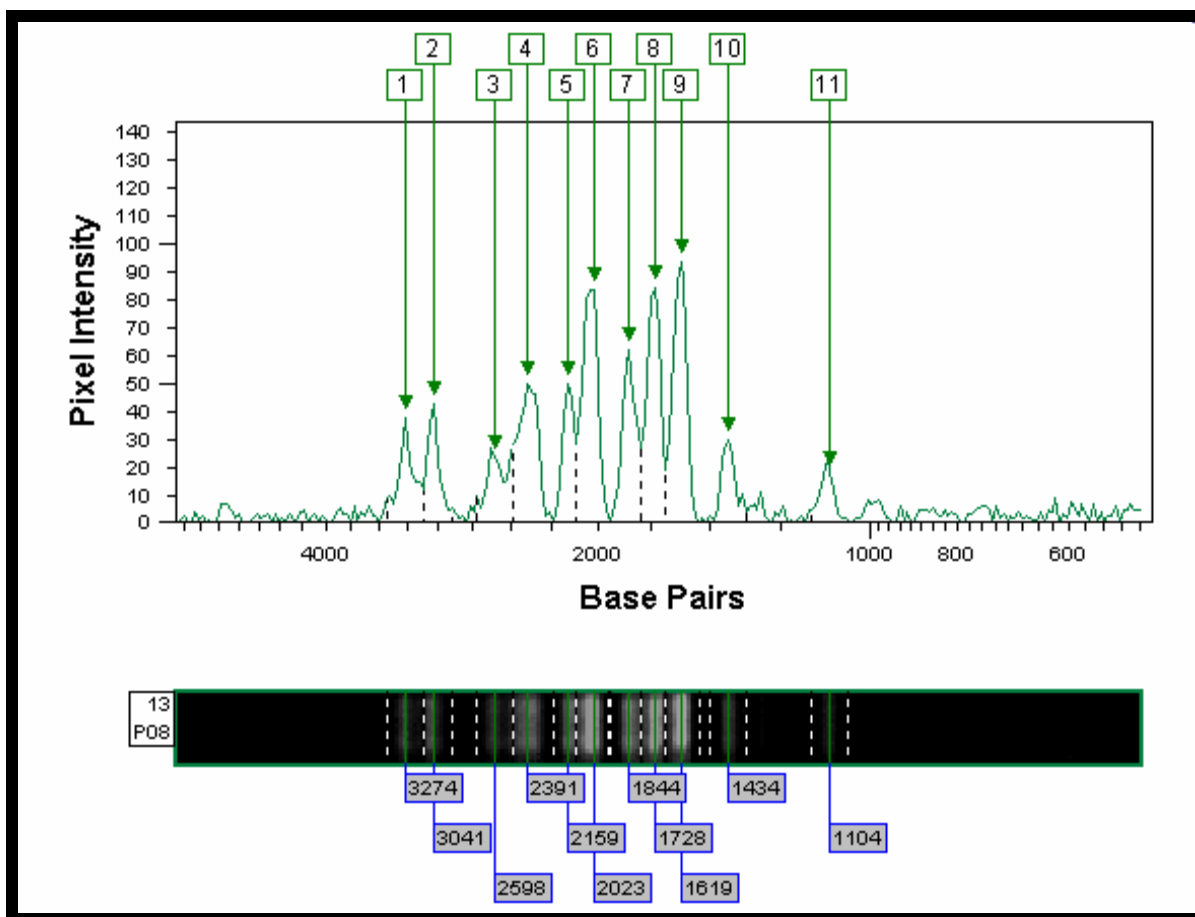


Figura 17. Resultados da análise do oligonucleotídeo OPA13, obtido de um espécime de Palmeiras, utilizando o *software Image Master 1D* (Amersham Pharmacia Biotech, EUA). Os alelos variaram de 1104 a 3274 pares de base e a intensidade dos 11 locos analisados de 25 a 90 pixels, conforme demonstrado no gráfico.

As bandas excluídas por oligonucleotídeo em função da intensidade que foi verificada pela altura do pico da banda, nas análises computacionais, estão demonstradas na tabela 7. O total de locos obtidos na matriz parcial foi de 53.

Tabela 7. Relação dos locos excluídos na confecção da matriz binária parcial.

<i>Oligonucleotídeos</i>	Número de locos excluídos	Total de locos analisados
OPA13	5	9
OPB6	2	5
OPB4	2	6
OPB10	5	5
OPB7	5	8
OPB11	5	7
OPB18	2	4
OPC20	3	9
Total	29	53

5.2. Variabilidade genética entre e dentro de populações

As 11 populações de *Eupemphix nattereri* apresentaram uma grande variabilidade genética que foi observada para os oito oligonucleotídeos de RAPD selecionados. Considerando a matriz completa, o número de locos, por oligonucleotídeo, variou entre 6 e 14, totalizando 82 locos nas 11 populações (Tabela 6). Desta forma, analisando a matriz completa, a proporção de locos polimórficos por população amostrada, variou entre 46% a 83%, com um valor global de 99%. Já na matriz parcial, a proporção de locos polimórficos variou entre 55% a 83% e o valor global foi de 100%.

A heterozigose observada, quando consideradas as matrizes total e parcial foi relativamente baixa, não variando muito entre as matrizes e dentro as populações, alcançando valores de 0,17 a 0,29, com um valor global de 0,37 na matriz completa e de 0,19 a 0,29 na matriz parcial, com um valor parcial de 0,36 (Tabela 8).

Tabela 8. Heterose (h) e porcentagem de locos polimórficos (LP), por população de *Eupemphix nattereri*, nas matrizes completa (MC) e parcial (MP), de acordo com Lynch & Milligan (1994)

População	N	hMC	hMP	LPMC (%)	LPMP (%)
Mambaí	20	0,29	0,29	82	83
Rio Claro	11	0,28	0,26	74,39	73,58
Morrinhos	22	0,27	0,25	82,93	81,13
Aporé	13	0,27	0,26	76,83	75,47
Chapadão do Sul	13	0,22	0,21	63,41	60,38
Palmeiras de Goiás	10	0,22	0,26	63,41	62,26
Cristianópolis	13	0,25	0,26	75,61	77,36
Alto Paraíso	21	0,27	0,23	81,71	77,36
Quirinópolis	13	0,24	0,22	65,85	67,92
Cocalzinho de Goiás	12	0,26	0,22	68,29	64,15
Cidade de Goiás	08	0,17	0,19	46,34	54,72
Geral	156	0,37	0,36	99	100

Embora não haja um padrão espacial claro da variabilidade intrapopulacional, é possível destacar, tanto na matriz completa, quanto na matriz parcial, algumas populações que apresentaram mais variação. As populações localizadas ao nordeste de Goiás, como Mambaí e Alto Paraíso, assim como as populações ao sudoeste de Goiás, como Aporé e Morrinhos, apresentaram maiores níveis de heterozigose e maiores índices de locos polimórficos (Tabela 8).

Visando avaliar a estrutura genética das 11 populações de *Eupemphix nattereri* amostradas, a primeira metodologia utilizada foi a análise de variância de frequências alélicas corrigidas (Lynch & Milligan, 1994). Na matriz completa, a variabilidade genética demonstrou estruturação nas populações com um valor global de θ igual a 0,36 (0,31-0,41/IC 95% com 1000 permutações). Conforme pode ser verificado na Figura 18, os valores relativos do coeficiente de parentesco (θ_P) para cada loco variaram entre 0 e 0,5.

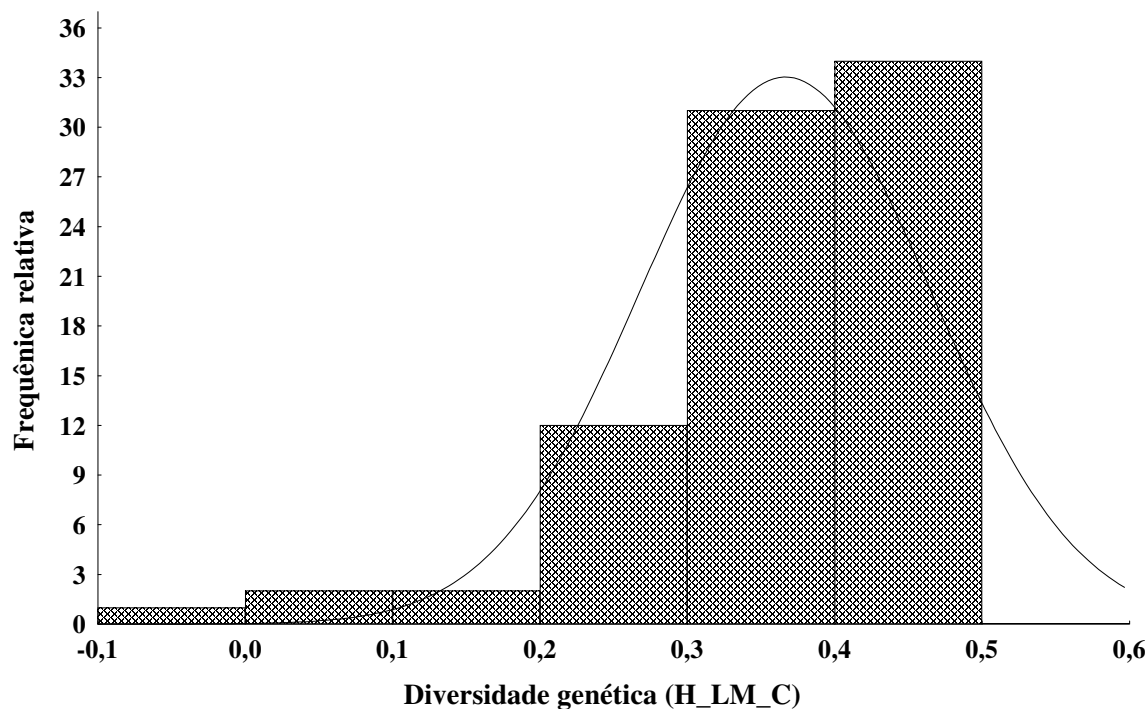


Figura 18. Frequência relativa dos valores de θ_p , de acordo com Lynch e Milligan, na matriz completa (HLMC), dos 82 locos analisados nas populações de *Eupemphix nattereri*.

Na matriz parcial, a variabilidade genética se mostrou estruturada nas populações com um valor global do coeficiente θ_p igual a 0,39 (0,32-0,46/IC 95% com 1000 permutações). Conforme pode ser verificado na figura 19, os valores de θ_p variaram de 0,15 a 0,5, apresentando uma amplitude de variação menor, quando comparada com a amplitude de variação da matriz completa. Além da correção proposta por Lynch & Milligan (1994), para se estimar o coeficiente de parentesco, em ambas as matrizes (completa e parcial), entre os indivíduos dentro de populações (θ_p) partiu-se do pressuposto de que as populações estavam em equilíbrio. Neste caso, a heterozigose observada, quando consideradas as matrizes total e parcial também foi relativamente baixa, não variando muito entre as matrizes

e dentro das populações, alcançando valores de 0,17 a 0,30, com um valor global de 0,37 na matriz completa e de 0,20 a 0,29 na matriz parcial, com um valor global de 0,36 (Tabela 9) (Figura 19). Tais valores foram praticamente idênticos aos encontrados pela correção de Lynch & Milligan (1994).

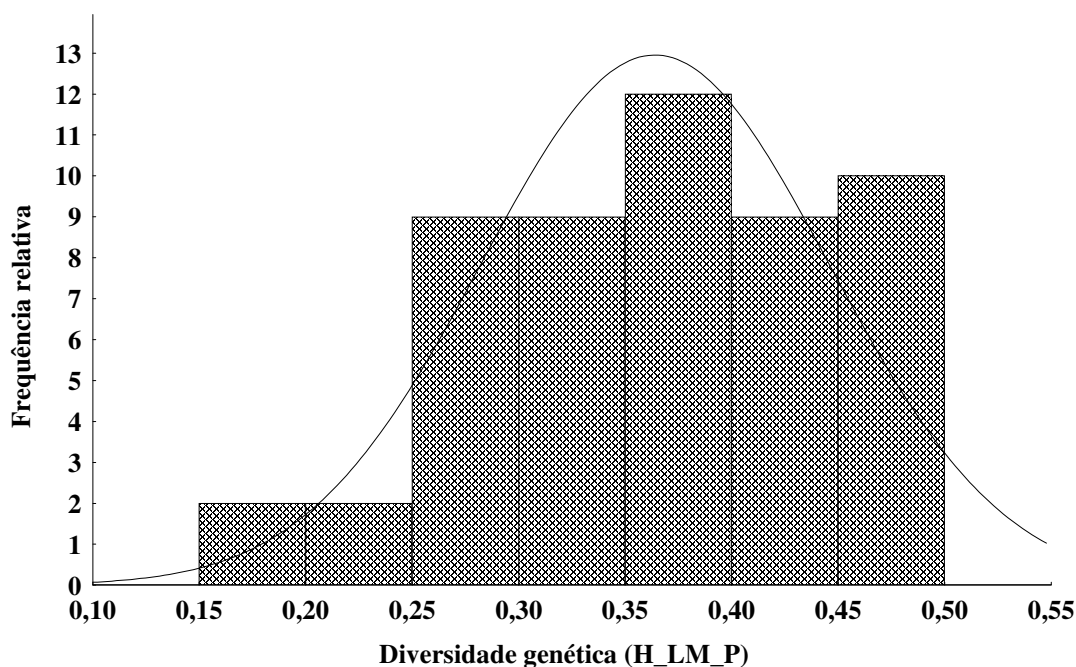


Figura 19. Frequência relativa dos valores de θ_p , de acordo com Lynch e Milligan, na matriz parcial (HLMP), dos 53 locos analisados nas populações de *Eupemphix nattereri*.

Tabela 9. Heterozigose (h) e porcentagem de locos polimórficos (LP), por população de *Eupemphix nattereri*, nas matrizes completa (MC) e parcial (MP), considerando equilíbrio de Hardy-Weinberg.

População	N	hMC	hMP	LPMC (%)	LPMP (%)
Mambaí	20	0,30	0,29	82	83
Rio Claro	11	0,28	0,27	74,39	73,58
Morrinhos	22	0,27	0,25	82,93	81,13
Aporé	13	0,27	0,27	76,83	75,47
Chapadão do Sul	13	0,22	0,21	63,41	60,38
Palmeiras de Goiás	10	0,22	0,22	63,41	62,26
Cristianópolis	13	0,25	0,27	75,61	77,36
Alto Paraíso	21	0,27	0,27	81,71	77,36
Quirinópolis	13	0,24	0,23	65,85	67,92
Cocalzinho de Goiás	12	0,26	0,22	68,29	64,15
Cidade de Goiás	08	0,17	0,20	46,34	54,72
Geral	156	0,37	0,36	99	100

Os valores de θ_p para cada loco RAPD, assumindo o equilíbrio de Hardy-Weinberg variaram de 0 a 0,5 na matriz completa (Figura 20) e de 0,15 a 0,50 na matriz parcial (Figura 21). Desta forma, os valores de θ_p foram idênticos aos calculados pela correção de Lynch & Milligan (1994).

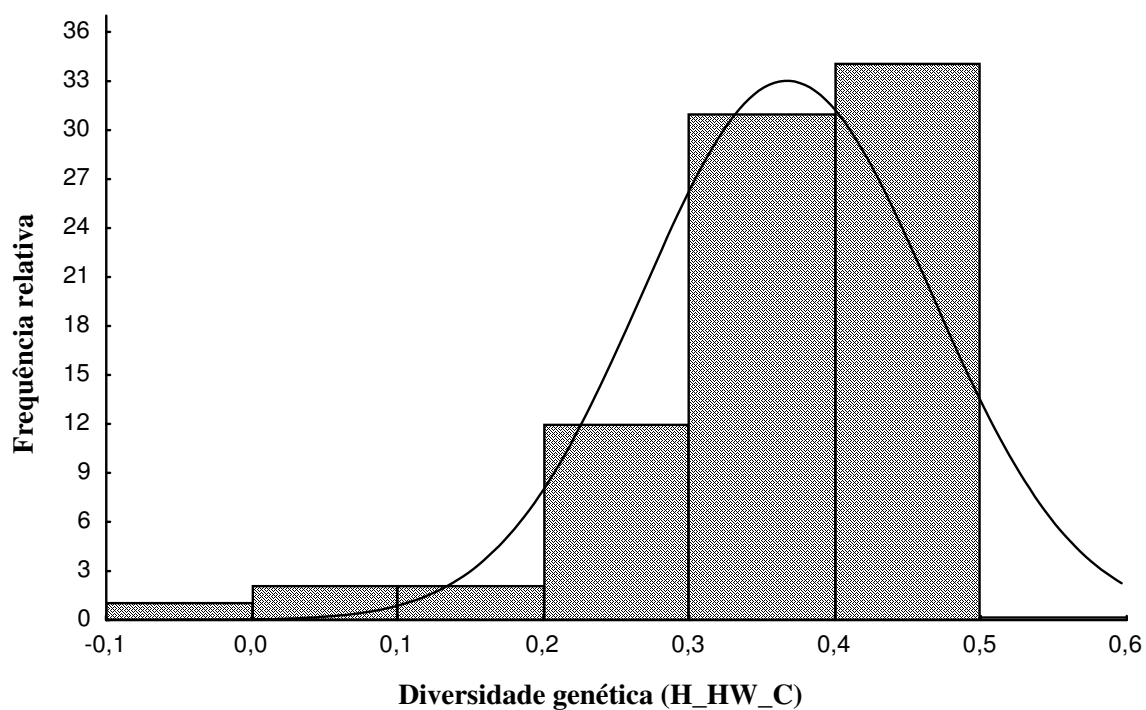


Figura 20. Frequência relativa dos valores de θ_p , presumindo o equilíbrio de H-W, na matriz completa (HHWC), dos 82 locos analisados nas populações de *Eupemphix nattereri*.

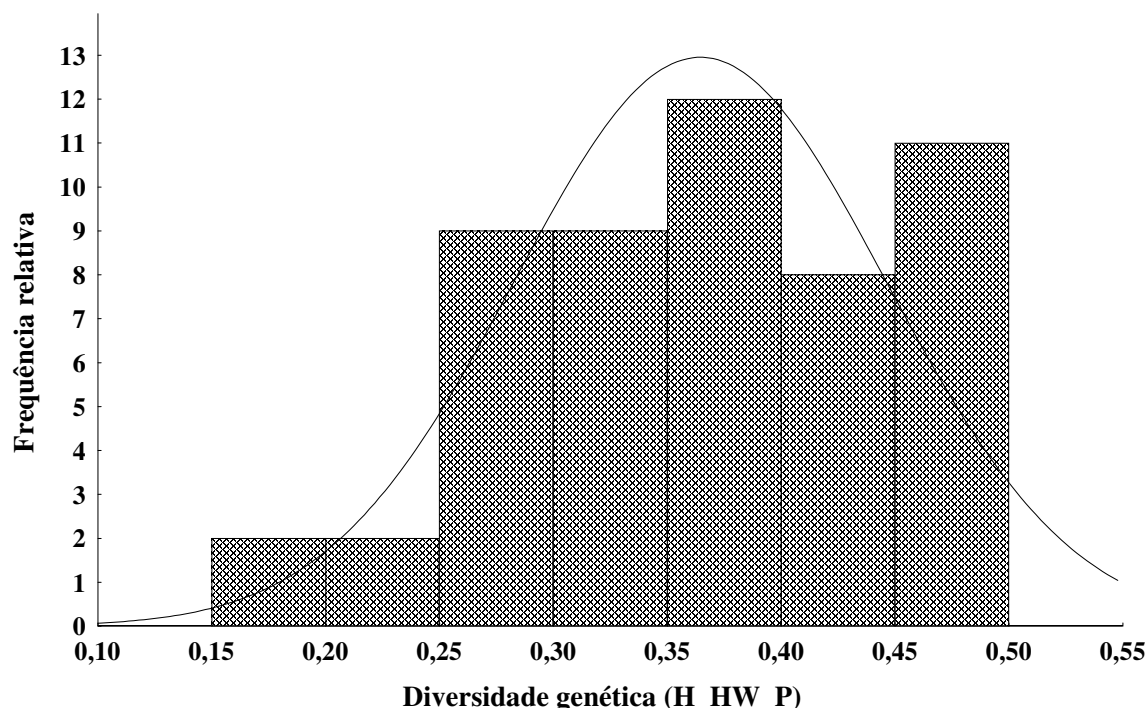


Figura 21. Frequência relativa dos valores de θ_p , presumindo o equilíbrio de H-W, na matriz parcial (HHWP), dos 53 locos analisados nas populações de *Eupemphix nattereri*.

A segunda metodologia utilizada para se avaliar a estrutura genética das populações de *Eupemphix nattereri*, foi a AMOVA. Essa metodologia forneceu uma estimativa global de $\Phi_{ST}=0,30$, na matriz completa e de 0,33 na matriz parcial ($p < 0,001$, com 1000 permutações). De acordo com o Φ_{ST} de 0,30, 69,6% da variância genética se refere ao componente intrapopulacional e 30,4% ao interpopulacional (Tabela 10).

Na matriz completa dos dados binários, os valores de Φ_{ST} para os pares de populações, variaram entre 0,23 a 0,42 (Tabela 11). Considerando a escala geográfica deste estudo (maior distância de 916 km), as 11 populações, independente das distâncias, apresentaram uma ampla divergência genética, como

no caso das seguintes populações: Mambai (1) e Alto Paraíso (8) com Φ_{ST} de 0,29; Alto Paraíso (8) e Cocalzinho de Goiás (10) com Φ_{ST} de 0,31; Cocalzinho de Goiás (10) e Cidade de Goiás (11) com Φ_{ST} igual a 0,35.

Tabela 10. Análise de Variância Molecular (AMOVA) baseada em 82 locos RAPD para 11 populações de *Eupemphix nattereri*

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	Variância	Variância total (%)	P**	Φ_{st}
População	10	956,8	95,7	5,9	30,4%	<0,001	0,3
Indivíduo	145	1944,4	13,4	13,4	69,6%	<0,001	

Tabela 11. Valores de Φ_{ST} par a par entre as 11 populações de *Eupemphix nattereri*, com base em 82 locos RAPD (matriz completa)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Mambaí (1)	0										
Rio Claro (2)	0.31	0									
Morrinhos (3)	0.26	0.32	0								
Aporé (4)	0.26	0.28	0.25	0							
Chapadão do Sul (5)	0.29	0.33	0.31	0.24	0						
Palmeiras (6)	0.31	0.36	0.28	0.37	0.31	0					
Cristianópolis (7)	0.25	0.29	0.24	0.24	0.31	0.34	0				
Alto Paraíso (8)	0.29	0.28	0.23	0.32	0.29	0.31	0.28	0			
Quirinópolis (9)	0.30	0.33	0.26	0.35	0.32	0.39	0.29	0.27	0		
Cocalzinho (10)	0,29	0,36	0,27	0,34	0,37	0,41	0,34	0,31	0,36	0	
Goiás (11)	0,36	0,40	0,25	0,33	0,39	0,41	0,30	0,39	0,42	0,35	0

A terceira metodologia utilizada para se avaliar a estruturação da variação genética das 11 populações de *E. nattereri* foi a estatística bayesiana. Dos quatro modelos obtidos por esta metodologia (Tabela 12), o que apresentou os menores valores de DIC e Dbar, tanto na matriz completa, quanto na matriz parcial, respectivamente, foi o “*full model*” (DIC= 3303,43 e Dbar= 2731,19; DIC= 2109, 91 e Dbar= 1741, 02). O θ^B da matriz completa foi de 0,36 e o da matriz parcial foi de 0,39. Os valores de f foram de 0,87 na matriz completa e 0,81 na matriz parcial, refletindo altos índices e assim como em Telles (2005), tais valores podem indicar um artefato gerado pelo pequeno número de indivíduos amostrados em algumas populações.

O segundo melhor modelo para a análise de estrutura genética foi o que assumiu $f=0$, de acordo com os valores de DIC de 3357, 25 e Dbar igual a 2729, 73, na matriz completa e DIC = 2147,1215 e Dbar = 1738,28, na matriz parcial. Os valores de θ^B foram de 0,29 na matriz completa e de 0,32 na matriz parcial, indicando uma pequena diferença de valores nas duas matrizes analisadas. O modelo que assumiu θ^B igual a zero e apresentou valores de DIC e Dbar, nas matrizes completa e parcial, respectivamente, de 7255,78 e 7175,73; 5016,70 e 4964,61 foi o menos explicativo. A confirmação destes resultados é demonstrada quando se analisa qual dos quatro modelos apresenta maior consistência dos parâmetros f e θ^B (Tabelas 13 e 14).

De acordo com os dados das matrizes completa e parcial, demonstrados nas tabelas 13 e 14, respectivamente, na estimativa de f no “*full model*” o valor de I_e foi o maior e a distância (H-d) a menor. No entanto, o valor de f neste modelo foi alto, sendo atribuído ao grande número de locos analisados (Telles, 2005; Holsinger & Lewis, 2003), em ambas as matrizes.

Apesar das diferenças entre os valores de DIC e D_{bar} , entre os quatro modelos demonstrados na tabela 12, o coeficiente θ^B , que é o parâmetro de maior interesse, parece estável entre os modelos e nas duas matrizes analisadas. Além disso, os valores estimados de θ^B , tanto na matriz completa, quanto na matriz parcial, estão de acordo com os outros dois estimadores de estruturação da variabilidade genética, θ_p e Φ_{ST} , indicando um significativo componente de variação entre as populações em torno de 30%.

Tabela 12. Resultados da análise bayesiana de variabilidade entre as 11 populações de *Eupemphix nattereri*, em relação aos quatro modelos testados (*full*, $f=0$, $\theta^B=0$ e *free f*), nas matrizes completa (MC) e parcial (MP).

Modelos	f MC	f MP	θ^B MC	θ^B MP	Dbar MC	Dbar MP	DIC MC	DIC MP
<i>Ful</i>	0,87	0,81	0,36	0,39	2731,2	1741,1	3303,4	2109,9
$F=0$	-	-	0,29	0,32	2729,7	1738,3	3357,2	2147,1
$\theta^B=0$	0,83	0,80	-	-	7175,7	4964,6	7255,8	5016,7
<i>free f</i>	0,51	0,47	0,34	0,37	2764,1	1763,1	3350,1	2144,8

Tabela 13. Resultados da análise bayesiana de divergência entre as 11 populações de *Eupemphix nattereri*, na matriz completa, demonstrando as estimativas de f , θ^B , a medida de informação I_e e a distância H-d entre a distribuição a *posteriori* para os quatro modelos testados.

Modelo	<i>full</i>		$f = 0$		$\theta^B = 0$		<i>free f</i>	
	I_e	H-d	I_e	H-d	I_e	H-d	I_e	H-d
f	1,17	-	-	-	1,04	-	-	-
θ^B	2,88	-	2,9	-	-	-	2,46	-

Tabela 14. Resultados da análise bayesiana de divergência entre as 11 populações de *Eupemphix nattereri*, na matriz parcial, demonstrando as estimativas de f , θ^B , a medida de informação I_e e a distância H-d entre a distribuição a *posteriori* para os quatro modelos testados.

Modelo	<i>full</i>		$f = 0$		$\theta^B = 0$		<i>free f</i>	
	I_e	H-d	I_e	H-d	I_e	H-d	I_e	H-d
f	0,81	-	-	-	0,86	-	-	-
θ^B	2,6	-	2,65	-	-	-	2,3	-

5.3. Padrões espaciais da divergência genética das populações

As análises de variabilidade genética entre e dentro das 11 populações indicaram uma ampla diferenciação populacional. Como demonstrado anteriormente, não houve diferenças significativas entre os parâmetros de variação calculados nas duas matrizes de dados, a completa e a parcial. Desta forma, a matriz completa foi utilizada nas análises dos padrões de distância genética entre as 11 populações de *E. nattereri* pelo agrupamento UPGMA.

De acordo com os valores dos coeficientes Φ_{ST} calculados na matriz completa de dados, as distâncias genéticas entre as populações variaram entre 0,23 a 0,42 (Tabela 11) (Figura 22). A correlação cofenética do UPGMA dessa matriz de distâncias foi relativamente baixa ($r= 0,71$), de modo que as ligações do dendograma não refletem corretamente os padrões multivariados de distância genética. Entretanto, o dendograma obtido representa as distâncias genéticas entre as onze populações, podendo ser útil na tentativa de se detectar padrões espaciais.

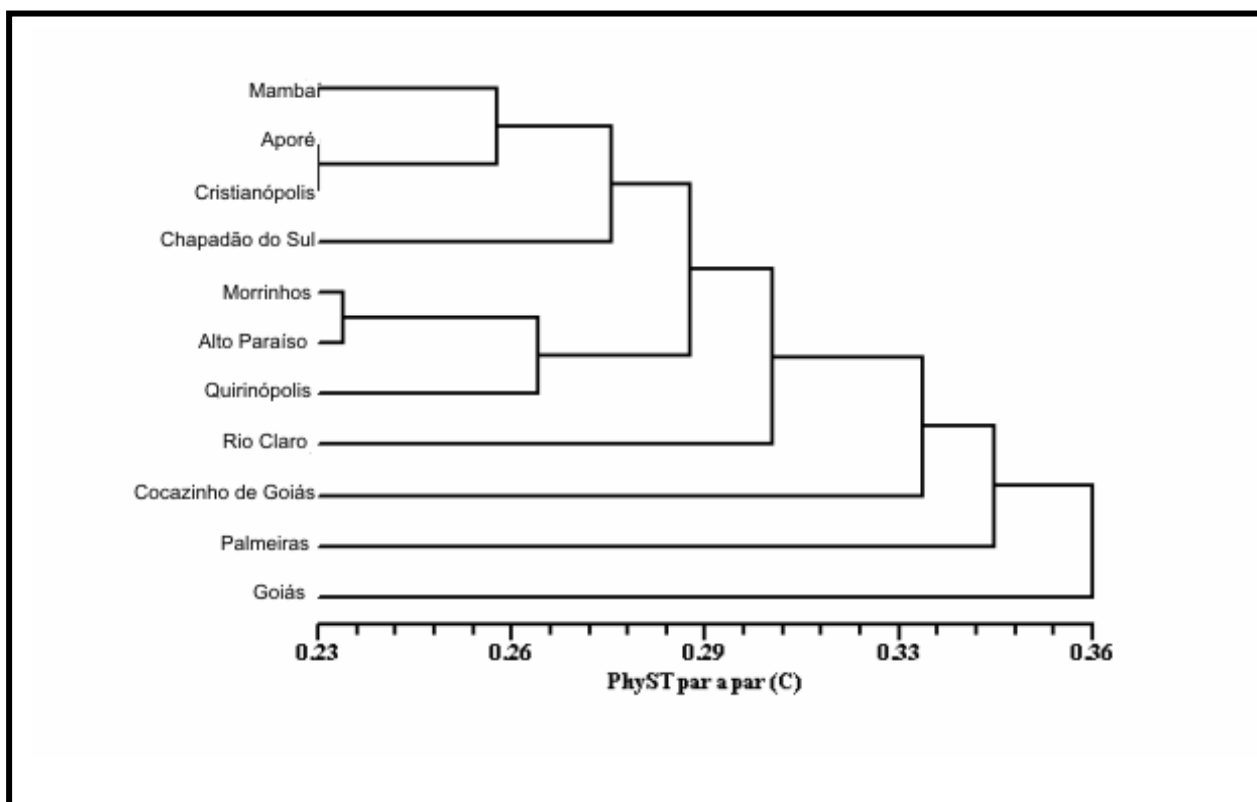


Figura 22. Padrão de divergência genética entre 11 populações de *Eupemphix nattereri*, definido pelo agrupamento UPGMA, com base nas distâncias genéticas (Φ_{ST}).

De acordo com o coeficiente θ_p , as distâncias genéticas entre as populações, assumindo o equilíbrio de Hardy-Weinberg, variaram entre 0,09 a 0,22 (Tabela 15) (Figura 23). Assim como para o Φ_{ST} , a correlação cofenética do UPGMA dessa matriz de distâncias também foi relativamente baixa ($r= 0,71$), não refletindo corretamente os padrões multivariados de distância genética. Quando realizado o método de correção de Lynch & Milligan, para se estimar as distâncias genéticas entre as populações, baseadas no coeficiente θ_p , tais distâncias também variaram de 0,09 a 0,22 (Tabela 16) (Figura 24). A correlação cofenética do UPGMA dessa matriz de distância também apresentou o valor de 0,71.

Tabela 15. Valores de θ_p par a par entre as 11 populações de *Eupemphix nattereri*, com base em 82 locos RAPD (matriz completa), assumindo o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Mambaí	0										
Rio Claro	0,19	0									
Morrinhos	0,12	0,17	0								
Aporé	0,14	0,12	0,12	0							
Chapadão do Sul	0,18	0,16	0,18	0,11	0						
Palmeiras	0,17	0,17	0,16	0,19	0,14	0					
Cristianópolis	0,12	0,12	0,10	0,09	0,15	0,16	0				
Alto Paraíso	0,15	0,13	0,13	0,13	0,14	0,15	0,12	0			
Quirinópolis	0,16	0,15	0,14	0,16	0,15	0,17	0,11	0,12	0		
Cocalzinho	0,15	0,19	0,13	0,17	0,19	0,21	0,14	0,17	0,18	0	
Goiás	0,21	0,19	0,14	0,17	0,19	0,20	0,15	0,22	0,21	0,14	0

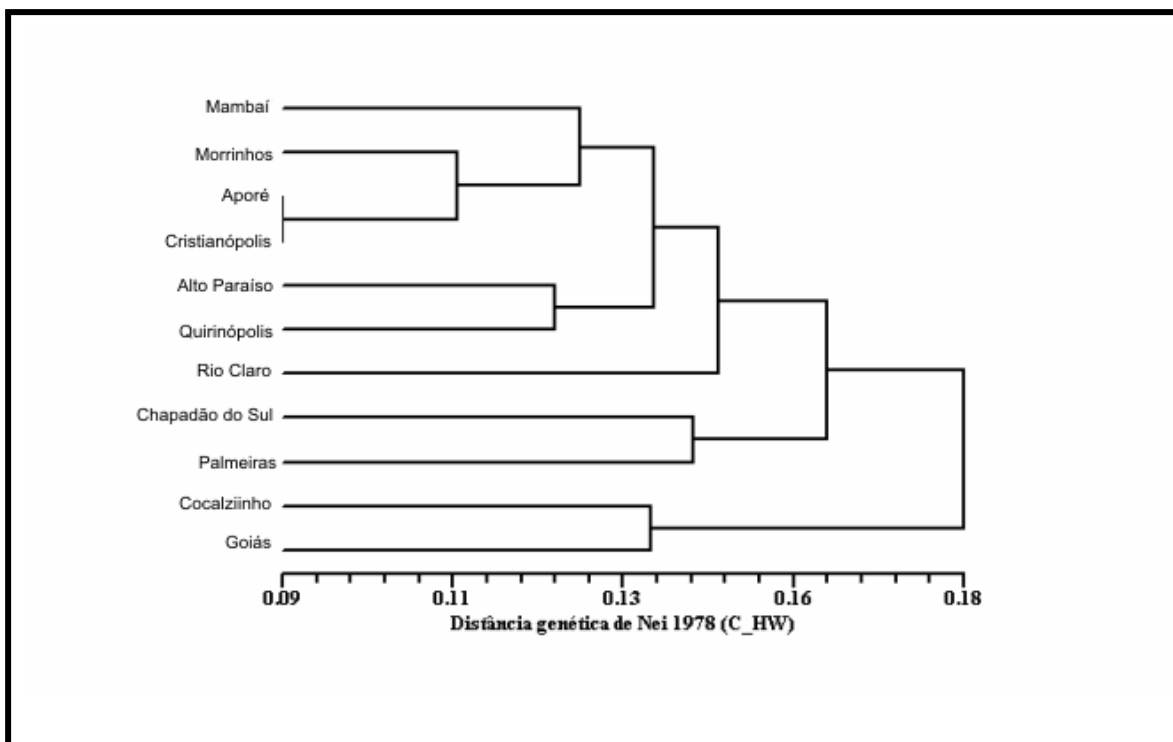


Figura 23. Padrão de divergência genética entre 11 populações de *Eupemphix nattereri*, definido pelo agrupamento UPGMA, com base nas distâncias genéticas de Nei (θ_p), assumindo o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

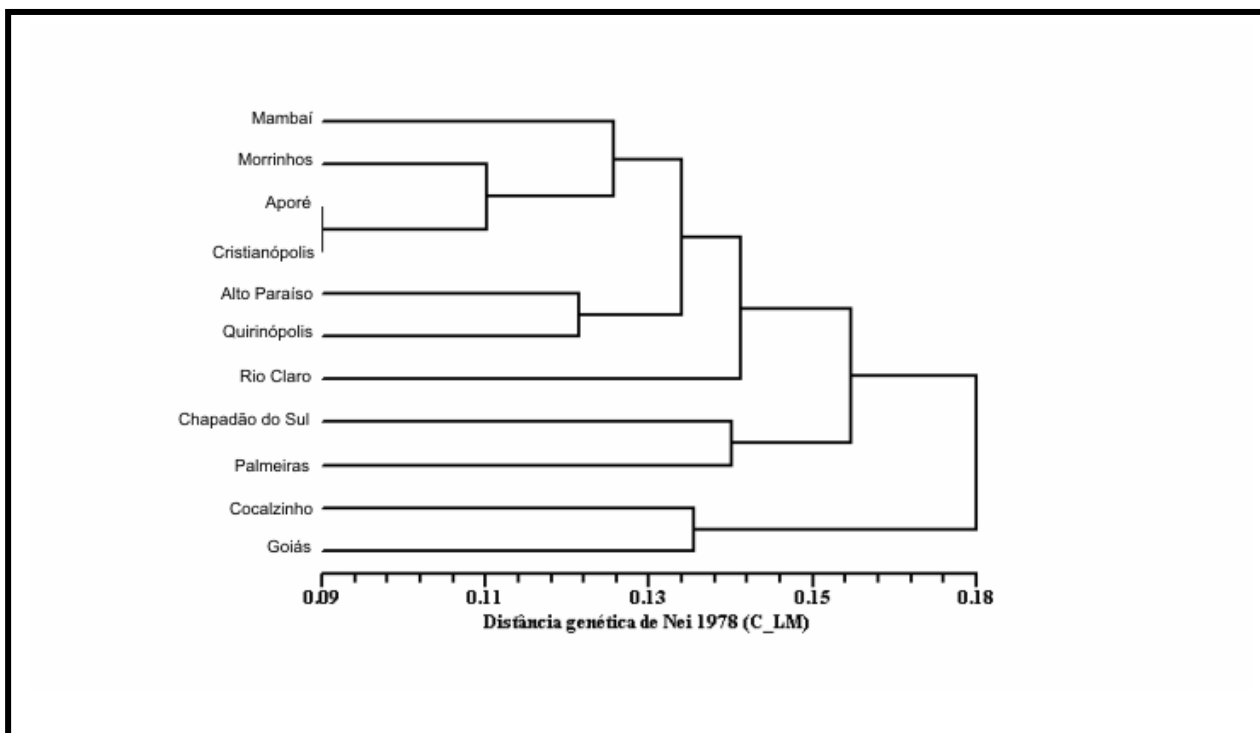


Figura 24. Padrão de divergência genética entre 11 populações de *Eupemphix nattereri*, definido pelo agrupamento UPGMA, com base nas distâncias genéticas de Nei (θ_p), utilizando-se a correção de Lynch & Milligan.

Finalmente, as distâncias genéticas entre as populações, de acordo com o coeficiente θ^B , variaram de 0,16 a 0,31 (Tabela 17) (Figura 25). A correlação cofenética, do UPGMA dessa matriz de distância, apresentou o valor de 0,61, menor em comparação às demais matrizes.

Tabela 17. Valores de θ^B par a par entre as 11 populações de *Eupemphix nattereri*, com base em 82 locos RAPD (matriz completa).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Mambaí	0										
Rio Claro	0,24	0									
Morrinhos	0,23	0,23	0								
Aporé	0,21	0,20	0,16	0							
Chapadão do Sul	0,25	0,24	0,26	0,19	0						
Palmeiras	0,26	0,24	0,24	0,25	0,21	0					
Cristianópolis	0,21	0,20	0,17	0,18	0,20	0,18	0				
Alto Paraíso	0,24	0,22	0,18	0,23	0,23	0,24	0,21	0			
Quirinópolis	0,23	0,26	0,23	0,27	0,27	0,26	0,20	0,22	0		
Cocalzinho	0,22	0,23	0,22	0,26	0,28	0,31	0,23	0,23	0,26	0	
Goiás	0,25	0,23	0,20	0,26	0,29	0,29	0,22	0,26	0,26	0,27	0

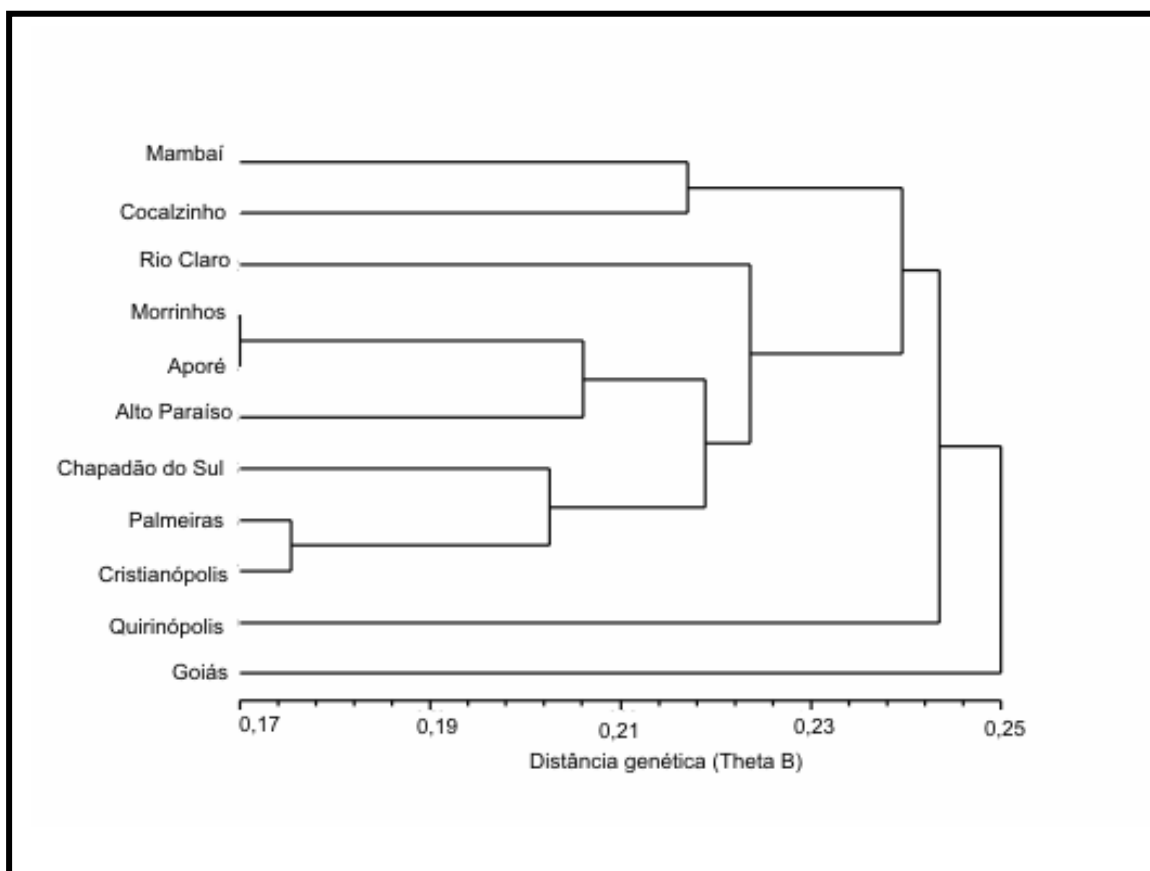


Figura 25. Padrão de divergência genética entre 11 populações de *Eupemphix nattereri*, definido pelo agrupamento UPGMA, com base nas distâncias genéticas (θ^B), de acordo com a estatística Bayesiana.

A relativa congruência detectada entre as distâncias genéticas descritas anteriormente, de acordo com os coeficientes θ^B , Φ_{ST} e θ_p , foi confirmada correlacionando as distâncias genéticas entre si, duas a duas (Tabela 18). Desta forma, ao correlacionar distâncias geográficas e genéticas, apenas a distância genética baseada no coeficiente Φ_{ST} foi utilizada.

Para analisar possíveis associações entre as distâncias genética e geográfica foi calculada a estatística de Mantel (Manly,1997). Os coeficientes de correlação matricial foram testados por meio de 1000 permutações aleatórias. O teste de Mantel apresentou uma correlação matricial entre a distância genética (Φ_{ST}) e geográfica igual a -0,03 ($p= 0,48$) (Figura 26). Assim, as onze populações estudadas não apresentaram um padrão espacial quanto às distâncias genéticas.

Tabela 18. Correlação linear simples entre as distâncias genéticas baseadas em três coeficientes [θ^B , Φ_{ST} e θ_p , (HW e LM)]. As correlações foram significativas com $p < 0.05$.
*HWC: Assumindo o equilíbrio de Hardy-Weinberg na matriz completa.
**LMC: Refere-se à correção de Lynch e Milligan na matriz completa.

	Φ_{ST}	θ^B	θ_p HWC	θ_p LMC**
Φ_{ST}	1	0,77	0,85	0,84
θ^B ,	0,77	1	0,74	0,74
θ_p HWC*	0,85	0,74	1	0,99
θ_p LMC**	0,84	0,74	0,99	1

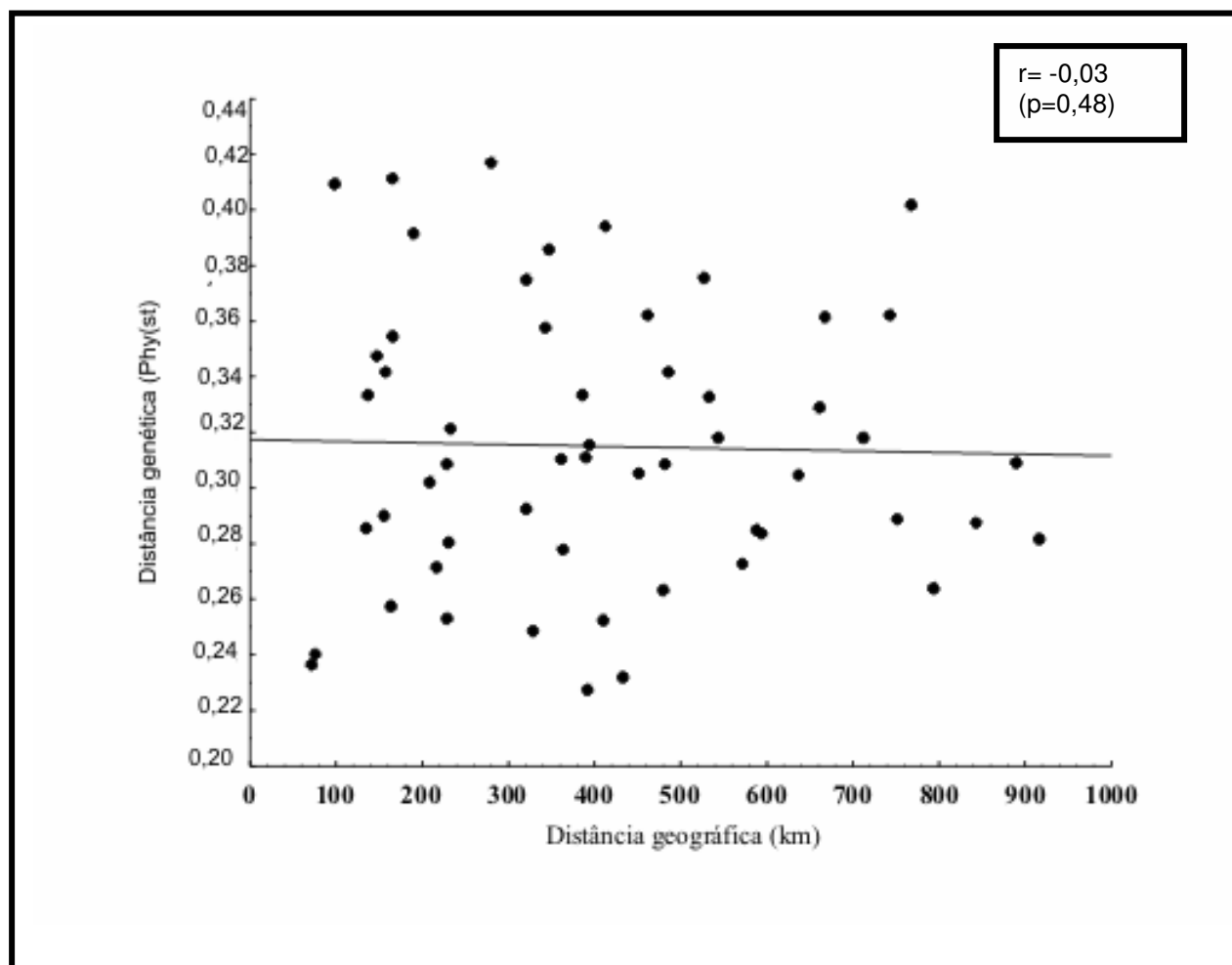


Figura 26. Correlação entre as distâncias genética (Φ_{ST}) e geográfica entre 11 populações de *Eupemphix nattereri*.

5.4. Análise de descontinuidade genética

A análise de descontinuidade genética (Figura 27) mostrou barreiras, que provavelmente interrompem o fluxo gênico entre as populações Palmeiras e Goiás; Palmeiras e Cocalzinho; Palmeiras e Cristianópolis; Morrinhos e Cristianópolis as três primeiras localizadas na região central do estado de Goiás e a última na região sudeste de Goiás. A única barreira que existe fora de Goiás se encontra entre as populações de Aporé (GO) e Chapadão do Sul (MS) (populações 4 e 5, respectivamente).

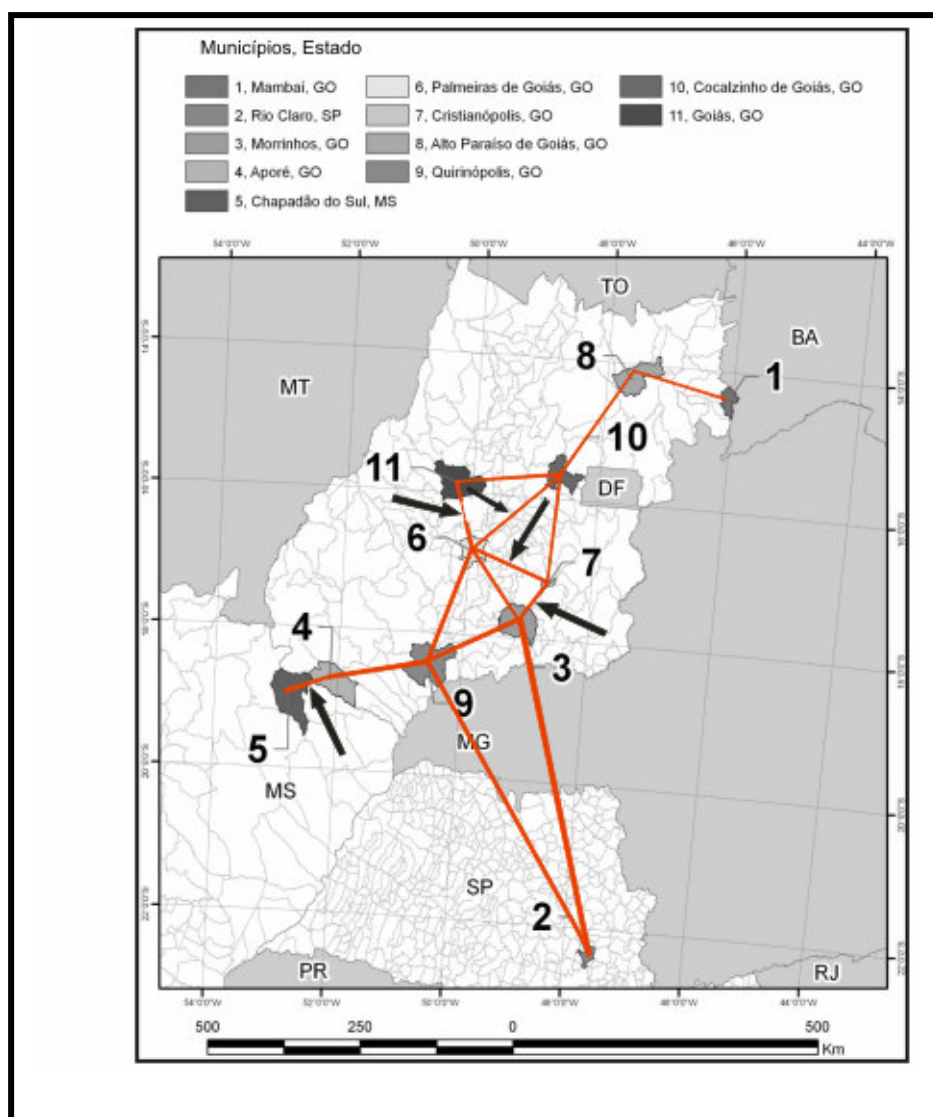


Figura 27. Resultados da análise de descontinuidade genética sobre a rede de Gabriel (1998).

5.5. Análises morfométricas

Para as análises morfométricas, foram utilizadas apenas as populações de Goiás, uma vez que os animais de Rio Claro (SP) e Chapadão do Sul (MS) não estavam depositados em Goiânia. A Análise de variância (ANOVA) detectou grandes diferenças entre as populações (Tabela 19) quanto a oito caracteres morfométricos, a seguir: CRC, LC, CF, CP, CT, DT, DNF e CC.

A Análise de Variáveis Canônicas confirmou as diferenças altamente significativas entre as populações (λ de Wilks= 0,17; $p < 0,001$). A primeira variável canônica (VC1) evidenciou diferenças entre as nove populações principalmente quanto aos caracteres CRC, LC e CC e a segunda variável canônica (VC2) em relação aos caracteres CF, CP e CT, sendo que essas três variáveis apresentaram valores positivos, estando relacionadas a medidas dos membros (Tabela 20). As médias dos escores por população da primeira e da segunda variáveis canônicas estão demonstrados na Figura 28.

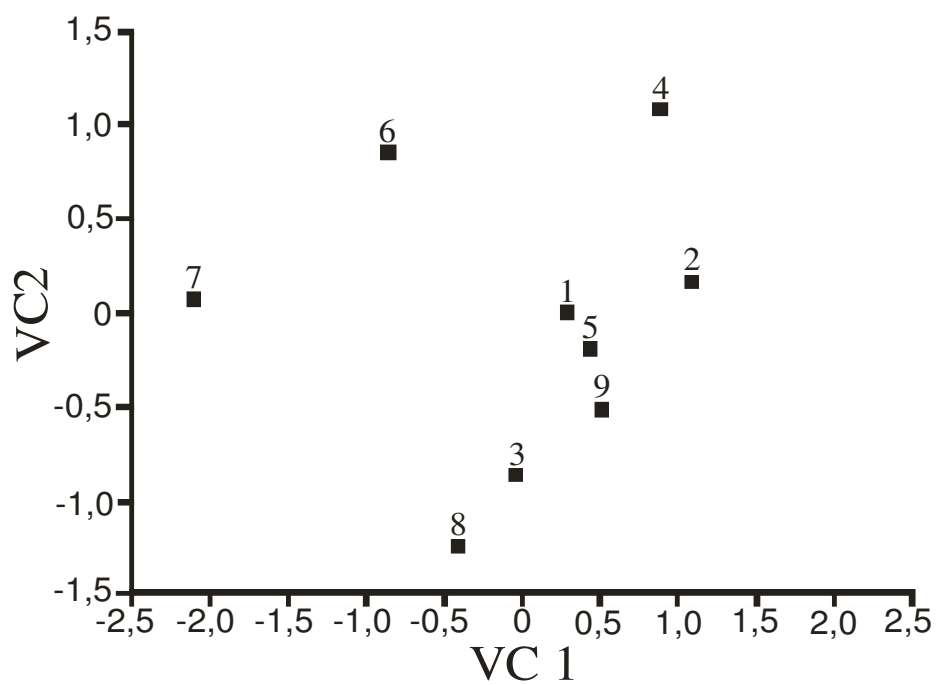
Tabela 19. Resultados da Análise de Variância dos 11 caracteres morfométricos analisados, demonstrando os valores de F e r^2

Variáveis morfométricas	F	r^2	P
CRC	8,7	35,8	
LC	6,8	30,2	
CF	4,1	20,9	
CP	5,0	24,1	P<0,005
CT	3,0	16,3	
DO	2,9	15,7	0,0051 (NS)*
DT	3,4	7,9	
DNF	4,0	20,4	P<0,005
DNO	2,0	11,4	
CC	4,7	23,2	
DOT	0,9	5,7	

* NS=estatisticamente não significativo.

Tabela 20. Coeficientes canônicos das variáveis originais logaritimizadas nos primeiros dois eixos.

Variáveis	VC1	VC2
CRC	-0,72	0,26
LC	-0,63	-0,05
CP	-0,33	0,45
CF	-0,26	0,47
CT	-0,16	0,41
DIO	-0,27	0,12
DT	-0,40	-0,09
DNO	-0,43	0,28
DO	-0,32	-0,05
CC	-0,52	-0,05
DNF	-0,15	0,14

**Figura 28.** Resultado da Análise Canônica demonstrando a posição relativa de cada população. Números 1 a 9 se referem às populações de Goiás listadas na tabela 1.

5.6. Associação do padrão espacial da variabilidade genética com dados morfométricos, microambientais e macroambientais

Os dados macroambientais apresentaram índices pluviométricos médios de 91,9 mm (DP= $\pm 6,8$), temperaturas anuais médias de 23°C (DP= $\pm 0,7$) e umidades relativas médias de 68,5% (DP= ± 2). As temperaturas do ar médias, assim como umidade e altitude dos dados microambientais foram de 25,5°C (DP= $\pm 3,3$), 70% (DP= ± 11) e de 789 m, (DP= ± 239), respectivamente.

Os resultados das correlações entre as matrizes, obtidos utilizando o teste de Mantel, foram sumarizados na Figura 29. Houve uma correlação estatisticamente significativa ($r=0,75$; $p=0,001$) entre as matrizes de distâncias geográficas e macroambientais, (índices pluviométricos, temperatura média e umidade média relativa do ar). Há tendências para uma correlação positiva ($r= 0,35$; $p=0,08$) entre as variações morfológica e genética (Figura 30) e uma correlação negativa entre variação morfológica e dados microclimáticos. Entretanto, não foram demonstradas correlações estatisticamente significativas entre as matrizes de distância morfológica e os dados macroambientais. Desta forma, as nove populações estudadas não apresentaram um padrão espacial, tanto para as distâncias genéticas quanto para as distâncias geográficas.

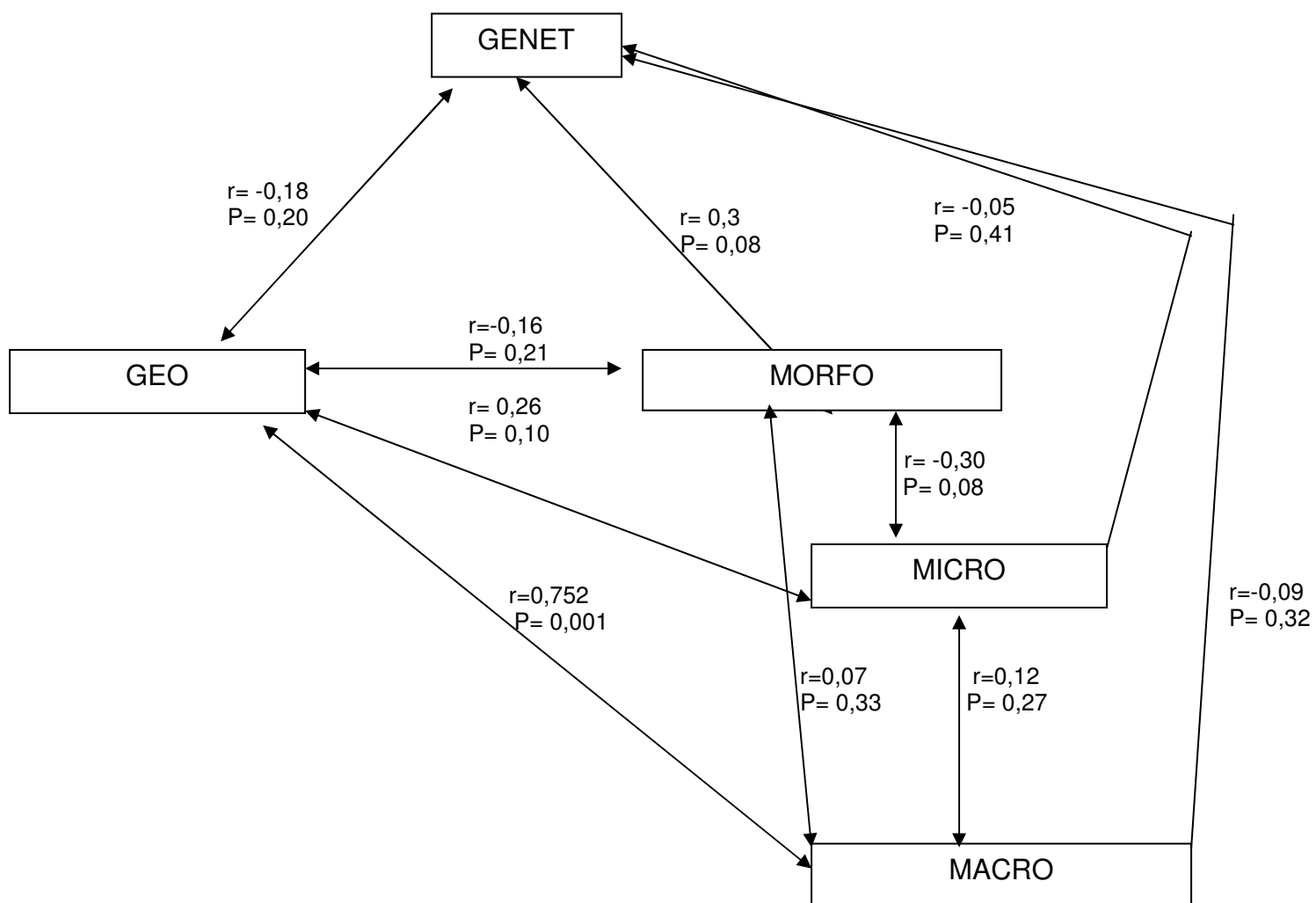


Figura 29. Resumo dos testes de Mantel realizados entre os dados geográficos (GEO), genéticos (GENET), morfométricos (MORFO), micro e macroambientais (MACRO).

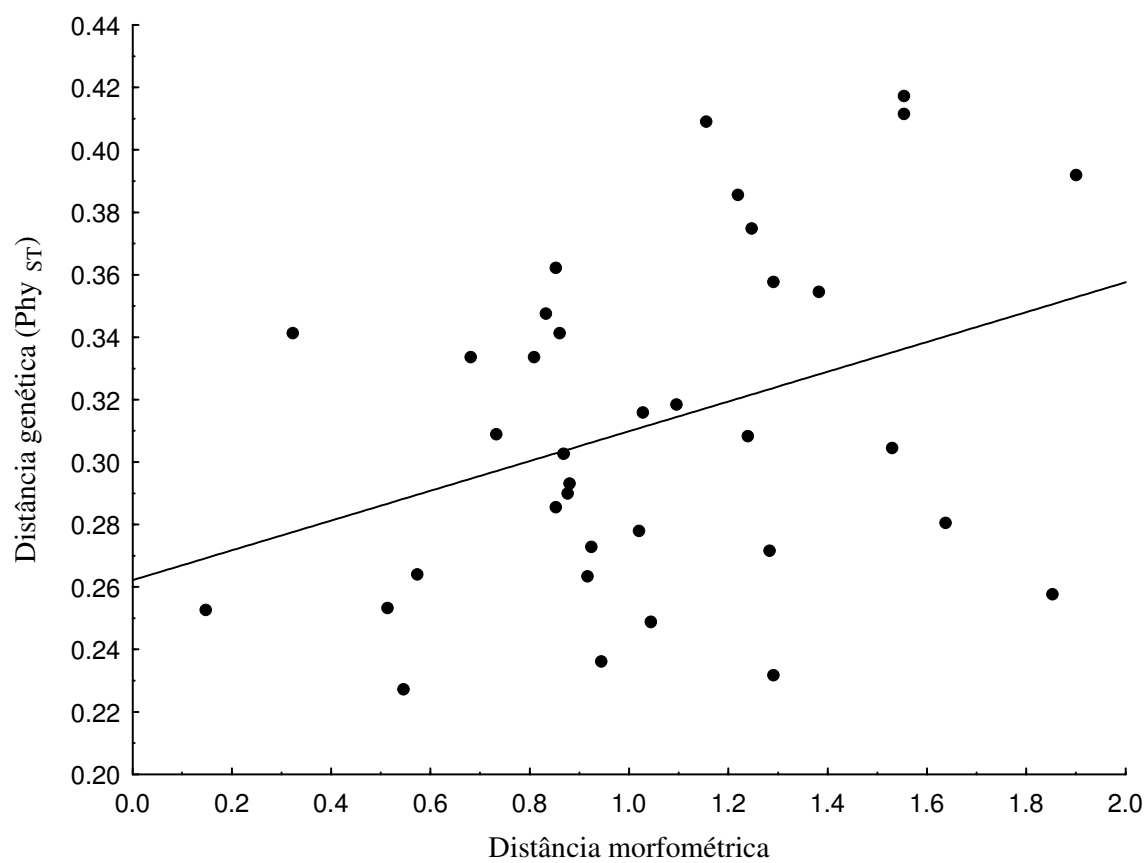


Figura 30. Representação gráfica do teste de Mantel realizado entre as distâncias genética (Φ_{ST}) e morfométrica nas 9 populações de *E. nattereri*.

6. DISCUSSÃO

6.1. Estrutura Populacional em *Eupemphix nattereri*

Em relação aos caracteres genéticos, os estimadores de diversidade genética calculados entre as 11 populações de *Eupemphix nattereri*, demonstraram valores em torno de 0,30. Quando comparados os valores de F_{st} ou outros coeficientes similares (Tabela 20), em geral, os anfíbios apresentam um alto grau de subdivisão populacional, em relação a qualquer outro táxon animal (Palo *et al.*, 2004). Não houve uma correlação estatisticamente significativa entre as distâncias genética e geográfica, indicando que locais geograficamente próximos não seriam geneticamente similares. Muitos estudos de variação genética intraespecífica em anuros têm sido realizados ao longo de largas escalas, de vários quilômetros, evidenciando uma substancial variação entre as populações (Lampert *et al.*, 2003; Trakimas *et al.*, 2003; Zeisset & Beebee, 2003; Telles *et al.*, 2006).

Como sugerido por Wright (1978) e Hartl & Clark (1989) para interpretar os valores de F_{st} podem ser utilizados alguns parâmetros, como os descritos a seguir: quando os valores de F_{st} variam entre 0 a 0,05 podem ser indicativos de pouca diferenciação genética; quando os valores de F_{st} variam entre 0,05 a 0,15 podem ser indicativos de moderada diferenciação genética; quando os valores de F_{st} variam entre 0,15 a 0,25 podem indicar alta variação genética e finalmente, valores acima de 0,25 podem indicar uma variação genética muito alta. Dessa forma, os valores dos estimadores de estrutura genética encontrados neste trabalho indicaram altos níveis de variação genética intrapopulacional em *Eupemphix nattereri*.

Tabela 21. Relação dos valores dos estimadores de estrutura populacional em diferentes grupos (Goodrum, 2002).

Espécies	Marcador es utilizados	Valores globais de Fst ou similares	Fontes
Humanos (5 populações)	SNP	0,13	Weir <i>et al.</i> , 2005
Lobos (América do Norte)	Microssatélites	0,17	Roy <i>et al.</i> , 1994
Pumas	Microssatélites	0,17	Culver <i>et al.</i> , 2000
Humanos (44 populações)	Microssatélites	0,12 (AMOVA)	Jorde <i>et al.</i> , 2000
Cachorros asiáticos (11 raças)	Microssatélites	0,15	Randi <i>et al.</i> , 2001
Gatos selvagens (Europa)	Microssatélites	0,13	Randi <i>et al.</i> , 2001
Coiotes	Microssatélites	0,11	Roy <i>et al.</i> , 1994
Jaguar	Microssatélites	0,07	Eizirik <i>et al.</i> , 2001
Búfalos africanos	Microssatélites	0,06	Van Hooft <i>et al.</i> , 2000
Ursos polares	Microssatélites	0,04	Paetkau <i>et al.</i> , 1999
Baleias	Microssatélites	0,03	Valsecchi <i>et al.</i> , 1997
AnfíbioS (<i>P. cuvieri</i>- 6 populações)	RAPD	0,15	Batista, 2001
Anfíbios (<i>P. cuvieri</i>- 18 populações)	RAPD	0,10	Telles <i>et al.</i>, 2006
Anfíbios (<i>Rana temporária</i>)	Microssatélites	0,30	Palo <i>et al.</i>, 2003

Neste estudo, análises dos padrões de amplificação dos marcadores RAPD das onze populações do leuperídeo *E. nattereri*, sugeriram que estas populações possam estar isoladas umas das outras. Além disto, mesmo em locais situados entre distâncias menores do que 50-Km, não foi demonstrada uma correlação estatisticamente significativa entre as distâncias genética e geográfica. Contudo, muitos estudos de variação genética intraespecífica em anuros têm sido realizados ao longo de largas escalas, de vários quilômetros, evidenciando uma substancial variação entre as populações (Lampert *et al.*, 2003; Trakimas *et al.*, 2003; Zeisset & Beebee, 2003; Telles *et al.*, 2006).

De acordo com Newman & Squire (2001), há outras explicações genético-evolutivas, além do fluxo gênico limitado, para a diferenciação local em marcadores neutros. Em escalas temporais e espaciais finas, nas quais a mutação é um fator

seletivo menos importante, a estrutura genética populacional depende do fluxo gênico e da dinâmica do tamanho populacional, determinando a taxa de deriva genética e a mudança das populações locais. Mesmo ocorrendo troca de material genético entre indivíduos de populações distintas, se o tamanho populacional for pequeno, a diferenciação pode ser o resultado de altas taxas de deriva genética. Desta forma, este fato pode ter ocorrido com as populações de *Eupemphix nattereri* amostradas neste estudo.

Os resultados das análises genéticas apresentados neste trabalho indicaram que as populações de *E. nattereri* estão randomicamente distribuídas e o fluxo gênico parece não ocorrer entre os locais de coleta. Na AMOVA, o coeficiente Φ_{st} encontrado foi de 0,30, evidenciando um alto grau de subdivisão populacional, como demonstrado em outras populações de anfíbios (Lampert *et al.*, 2003; Smith & Green, 2004; Palo *et al.*, 2004). Apesar da AMOVA ter demonstrado um componente de variação interpopulacional de 30%, a população não se apresenta estruturada no espaço geográfico, de acordo com os testes de Mantel.

Tais resultados estão parcialmente de acordo com um recente estudo utilizando marcadores RAPD em 18 populações do anfíbio anuro *Physalaemus cuvieri*, localizadas ao longo do estado de Goiás (Telles *et al.*, 2006). No trabalho de Telles *et al.* (2006) foram analisados 126 locos de RAPD e tal estudo indicou uma moderada estruturação da variabilidade genética (Tabela 20) para a rã-cachorro (*Physalaemus cuvieri*) em Goiás. Nesse caso, como encontrado neste trabalho, apesar das diferenças significativas entre as 18 populações, o padrão espacial encontrado foi fraco, o fluxo gênico estava restrito a populações geograficamente próximas e as populações de *Physalaemus cuvieri* estavam evoluindo sob um modelo de isolamento-por-distância.

A hipótese de que populações de anfíbios tendem a ser relativamente isoladas umas das outras, como resultado de um baixo fluxo gênico e ausência de migração, mesmo em uma escala fina, é uma evidência de um alto nível de estruturação genética populacional (Shaffer *et al.*, 2000; Lampert *et al.*, 2003). Outras pesquisas, envolvendo variação genética intraespecífica em anfíbios, realizado em escalas pequenas e grandes, de vários quilômetros também evidenciaram variação entre populações deste grupo (Rowe *et al.*, 1998; Lampert *et al.*, 2003; Burns *et al.*, 2004, Palo *et al.*, 2004).

Os resultados deste estudo são bastante similares aos achados das análises genéticas realizadas no anuro *Rana ridibunda* utilizando marcadores RAPD e microssatélites. Nesta pesquisa, os autores encontraram que a variância entre as populações foi de 24,7% e dentro das populações foi de 72,6% (Zeisset & Beebee, 2003). Além disto, o coeficiente Φ_{st} estimou uma diferenciação genética significativa entre a maioria das populações de *Rana ridibunda*, como mostrado para *Eupemphix nattereri*. Em outro estudo, realizado com populações de *Bufo calamita*, utilizando-se microssatélites, os locais de coleta localizavam-se em distâncias entre 0,5 a 9,0 km. O coeficiente Φ_{st} encontrado foi de 0,11 (Rowe *et al.*, 2000), um valor menor do que o encontrado por esta pesquisa.

Contudo, outros estudos de estrutura genética de *Bufo canorus* e *Geocrinia rosea* também evidenciaram valores de Φ_{st} entre 0,2 e 0,6, com a utilização do polimorfismo de DNA fita simples (SSCP) e isoenzimas, respectivamente (Driscoll, 1998; Shaffer *et al.*, 2000). Desta forma, este e os outros estudos relatados, sobre estruturação populacional de anfíbios, indicam que fatores ecológicos e ambientais

podem também criar estruturas genéticas, em escalas locais, dependendo da espécie investigada (Palo *et al.*, 2003; Rissler *et al.*, 2004; Rowe & Beebee, 2004).

Em um outro trabalho sobre variação geográfica, estrutura genética e conservação da salamandra *Plethodon larselli*, utilizando marcadores RAPD e duas sequências do citocromo *b*, os autores evidenciaram uma significativa estruturação populacional do grupo de salamandras, localizados ao sul ($F_{st}=0,44$) e ao norte ($F_{st}=0,13$) do rio Columbia nos Estados Unidos. Os dois marcadores utilizados mostraram resultados similares evidenciando que as 15 populações estudadas diferem significativamente uma da outra devido a mudanças ambientais e a barreiras geográficas ao longo do rio Columbia (Wagner *et al.*, 2005).

A variação genética de 12 populações de *Hyla arborea*, baseada no coeficiente F_{st} , com marcadores microssatélites foi altamente significativa, apresentando valores médios de F_{st} , de 0,22 ($p<0,001$) (Andersen *et al.*, 2004). Neste caso, os valores de F_{st} , obtidos se encontram entre os maiores já obtidos para anfíbios, dada a escala geográfica da coleta (1,1-43,2 km) (Newman & Squire, 2001). Apesar dos níveis dos coeficientes calculados nesse estudo terem variado em torno de 0,30, o que também representa altos valores para anfíbios, a escala de coleta variou de 41 a 916 km.

Em outro trabalho, o nível de diferenciação genética, também baseado no coeficiente F_{st} , evidenciado pelo grupo de Spear *et al.* (2005), com marcadores microssatélites, na salamandra *Ambystoma tigrinum melanostictum* foi de 0,24. Este resultado também foi similar ao valor de Φ_{st} encontrado neste trabalho. Portanto, medidas de F_{st} e Φ_{st} se mostram adequadas para estimar diferenciação genética (Whitlock & MacCauley, 1999). Desta forma, algumas espécies de anfíbios também apresentam estruturação genética, mesmo quando as populações se localizam entre

distâncias menores que 5 km (Rowe *et al.*, 2000; Lampert *et al.*, 2003; Andersen *et al.*, 2004; Burns *et al.*, 2004). Tais resultados mostram que um fluxo gênico limitado pode promover diferenciação em populações locais, devido principalmente à fragmentação de habitats, podendo acarretar gargalos populacionais e endogamia (Andersen *et al.*, 2004).

Entretanto, muitos dos estudos sobre estrutura populacional de anfíbios foram realizados com DNA mitocondrial, o qual é mais dependente da história de fundação de cada população, devido ao modo de herança do DNA da mitocôndria e a marcadores microssatélites, que embora sejam nucleares, são codominantes. Desta forma, as comparações entre marcadores devem ser feitas com cautela, principalmente entre marcadores nucleares e citoplasmáticos, pois a evolução do genoma nuclear ocorre de maneira distinta dos genomas das organelas.

Neste estudo, a diferenciação genética entre as populações pode ser explicada pela fidelidade ao local de reprodução, uma característica encontrada em muitas espécies de anfíbios. Isto significa que uma vez prontos para acasalar, a maioria dos adultos retorna para a poça de origem (Rowe *et al.*, 2000). Contudo, as baixas taxas de dispersão de *E. nattereri* devem ser confirmadas através de técnicas de captura-marcação e recaptura associadas com marcadores moleculares.

A análise de discontinuidades genéticas revelou que algumas populações apresentaram uma maior variabilidade genética, do que o esperado, em relação à distância geográfica. Uma das possíveis explicações para este resultado é a fragmentação de ambientes naturais. Apesar de *E. nattereri* ser uma espécie de ampla distribuição geográfica e de áreas abertas, a fragmentação pode estar diminuindo a dispersão de alguns indivíduos e acarretando como consequência um decréscimo no

fluxo gênico. Além disso, *E. nattereri* se reproduz no começo da estação chuvosa o que também pode ter contribuído para uma menor dispersão dos indivíduos e uma maior fidelidade ao corpo d'água.

Assim como no trabalho de Telles (2005), com outro leptodactílideo, o *Physalaemus cuvieri*, houve uma coincidência entre a presença de barreiras e o padrão atual de fragmentação da paisagem natural no Estado de Goiás (Figura 30). As barreiras situadas na região sudeste do Estado de Goiás parecem estar associadas a fragmentações de habitats, o que pode ter proporcionado os altos índices de variabilidade populacional em *Eupemphix nattereri*.

A fragmentação de habitats é hoje uma das maiores ameaças à diversidade biológica, tanto pela redução dos ambientes, como pela divisão de habitats remanescentes em fragmentos menores e isolados (Wilcox & Murphy, 1985; Soulé & Kohm, 1989; Meffe & Carrol, 1997). Fragmentos representam os últimos remanescentes da biodiversidade em regiões onde as atividades antrópicas são prioritárias. A extinção global das espécies, como soma ou acúmulo de extinções locais e regionais (Merriam & Wegner, 1992), tem sido associada ao processo de fragmentação de habitats através da atividade antrópica (Wilcox & Murphy, 1985).

Os resultados deste trabalho indicaram que populações do leptodactílideo *Eupemphix nattereri* estão randomicamente distribuídas no espaço, apresentando altos níveis de estruturação genética, apesar da ausência de correlação entre as distâncias genéticas e geográficas. Concluindo, pode-se inferir que a baixa dispersão de *E. nattereri* dentro de escalas de 50 km evidenciam fidelidade ao sítio de reprodução, resultando em fluxo gênico reduzido e alta diversidade genética para esta espécie.

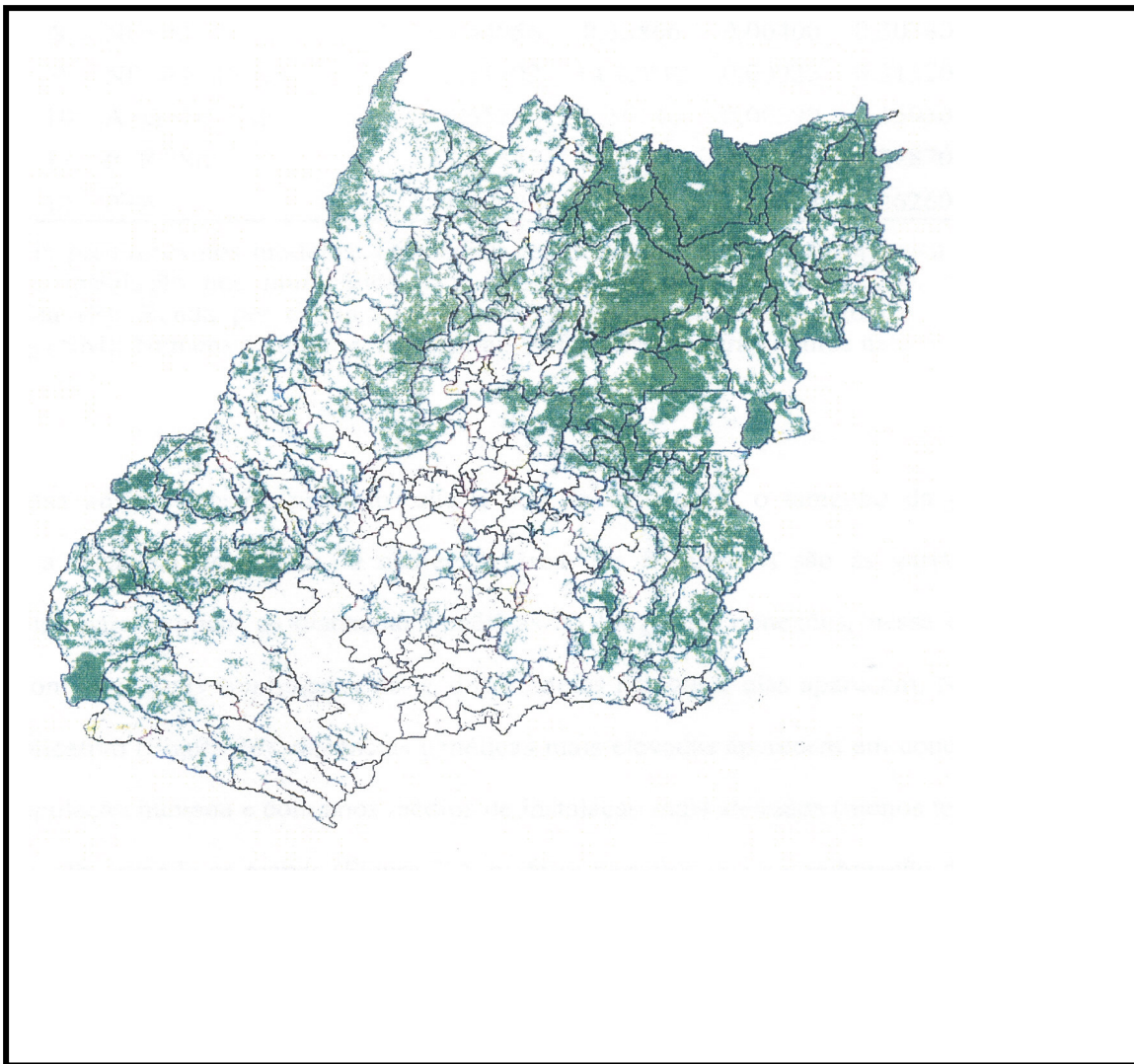


Figura 31. Mapa do Estado de Goiás ilustrando a presença de áreas desmatadas (em branco) e áreas de remanescentes florestais (em verde).

Fonte: AGMA (Agência Goiana do Meio Ambiente).

6.2. Associações entre dados fenotípicos e genéticos

Caracteres morfométricos têm sido empregados para descrever variação geográfica intraespecífica, uma vez que são poligeneticamente controlados, refletindo a interação de um grande número de locos (Atchley *et al.*, 1982). Muitos estudos realizados com diferentes vertebrados têm demonstrado que o padrão de variação

morfométrica pode ser explicado tanto pela seleção natural das condições ecológicas quanto pela influência do fluxo gênico (Castellano & Giacoma, 1998; Castellano *et al.*, 1999; 2000; Rosso *et al.*, 2004).

Alguns estudos a respeito da variação morfológica de vertebrados têm empregado os anfíbios como modelo (Castellano & Giacoma, 1998; Castellano *et al.*, 1998; Castellano *et al.*, 1999; Babik & Rafinski, 2000; Castellano & Giacoma, 2000; Méndez *et al.*, 2004; Schäuble, 2004; Rosso *et al.*, 2004; Buskirk & Arioli, 2005), tendo evidenciado significativas variações geográficas no tamanho corporal deste grupo. Castellano & Giacoma (1998) relataram em dez populações de *Bufo viridis* um padrão complexo de variação geográfica em relação a 21 caracteres morfométricos, sendo as diferenças entre as populações atribuídas principalmente ao tamanho corporal.

Neste estudo, na análise de variância univariada foram detectadas diferenças estatisticamente significativas com relação a cinco caracteres morfométricos, sendo três relacionados a parâmetros de medidas dos membros (comprimento do fêmur, comprimento da tíbia e comprimento do pé). O tamanho corporal e a largura da cabeça foram as duas variáveis que mais contribuíram para estas diferenças, como encontrado em outras pesquisas (Castellano & Giacoma, 1998; Castellano *et al.*, 1998; Castellano *et al.*, 1999; Babik & Rafinski, 2000; Castellano & Giacoma, 2000; Méndez *et al.*, 2004; Schäuble, 2004; Rosso *et al.*, 2004). Sabe-se que o tamanho do corpo é um traço morfológico fundamental, importante nos contextos fisiológico, ecológico e social (Schaüble, 2004). Entretanto, neste estudo, de acordo com a análise de variáveis canônicas, a variação nos caracteres morfológicos não apresentou um padrão espacial, havendo muita sobreposição das populações quantos às variáveis morfométricas, como evidenciado por outros grupos (Gascon *et al.*, 1996; Babik & Rafinski, 2000;

Rafinski & Babik, 2000). De acordo com as análises morfométricas das nove populações de *E. nattereri*, estas não estão estruturadas no espaço, apresentando uma distribuição aleatória.

Em um trabalho realizado com 22 populações de *Physalaemus cuvieri* coletadas no Cerrado do Brasil Central, os indivíduos localizados em áreas mais secas, ao norte, apresentaram tamanhos maiores (Juliano, 2003). Todavia, esta diferença de tamanho ao longo de um gradiente latitudinal de umidade, pode ser devido ao fato de os animais de clima mais úmido se reproduzirem mais cedo em relação a populações de clima mais seco, sendo o tamanho apenas uma consequência (Castellano *et al.*, 2000). Outro componente que influencia a variação morfológica é a vegetação característica das populações amostradas. A maioria dos caracteres morfológicos é altamente correlacionada entre si, tanto o tamanho do corpo quanto a forma do corpo variam conforme o tipo de vegetação (Juliano, 2003; Rosso *et al.*, 2004).

Neste estudo, apesar das nove populações de *E. nattereri* terem sido coletadas somente em áreas de Cerrado, sabe-se que esta vegetação é um mosaico, sendo que áreas mais próximas não possuem o mesmo tipo de vegetação (Brasileiro *et al.*, 2005). Como tais populações não apresentaram um padrão espacial morfométrico relacionado com variáveis ambientais como, temperatura, umidade, precipitação, latitude e longitude, as pressões seletivas, como a deriva genética, a plasticidade fenotípica e fluxo gênico podem ter agido sobre a forma do corpo nestes espécimes, estando fortemente dependentes do tipo de habitat (Wilczynsky & Ryan, 1999).

Além disto, em anfíbios anuros, o tamanho do corpo dos adultos depende de vários fatores como: tempo da metamorfose, taxa de crescimento antes e após a maturidade, idade da maturidade e longevidade (Moravec, 1990; Augert & Jloy, 1993;

Friedl & Klump, 1997; Rosso *et al.*, 2004). Diferenças genéticas e ambientais entre indivíduos podem acarretar diversidade dos fatores ontogenéticos, resultando em variação corporal. Neste caso, além de fatores ecológicos, como a vegetação, fatores genéticos, como fluxo gênico restrito e ontogenéticos podem explicar a variação dos caracteres encontrados em *E. nattereri*. Desta forma, tais fatores também podem agir em sinergia aumentando ou atenuando as variações dos espécimes (Rosso *et al.*, 2004). Estes padrões complexos não devem ter sido “capturados” pelas variáveis ambientais utilizadas nesse estudo, o que explicaria a baixa correlação observada entre as matrizes de distância fenotípica e ambientais.

De qualquer modo, a tendência a uma correlação estatisticamente significativa entre os dados morfométricos e genéticos nas populações de *Eupemphix nattereri* indicam que a divergência entre as populações dessa espécie deve seguir um modelo de isolamento-por-distância, no qual tanto a variação morfométrica quanto a genética estariam sendo influenciadas pela estruturação espacial (embora em uma escala espacial menor do que a analisada nesse trabalho). Como a variação genética é provavelmente neutra e não pode ser causalmente associada a variação morfométrica, a tendência a uma correlação positiva só pode ser explicada pelo isolamento-por-distância.

Além disso, é preciso considerar que outros fatores em escalas mais locais, não analisados neste trabalho, como temperatura e pH dos poços e brejos durante o desenvolvimento da larva, podem ter influenciado as variáveis morfométricas, como descrito por outros grupos (Pakkasmaa *et al.*, 2003; Räsänen *et al.*, 2003), uma vez que o efeito da água na morfologia e no desenvolvimento larval é um fator relevante que afeta o tamanho corporal em ecotérmicos (Atkinson, 1996). Vários estudos

recentes têm indicado que os anfíbios evitam habitats abertos, tais como campos e estradas, se movimentando mais em áreas florestais (Madison & Farrand, 1998; Rothermel & Smelstch, 2002). Isto ocorre devido a riscos aumentados de dessecação e predação nestas áreas (Spear *et al.*, 2005). Como os locais de amostra são representativos do Cerrado, sendo caracterizados como áreas abertas e fragmentadas em alguns locais, tais fatores podem ter reduzido o fluxo gênico, proporcionando simultaneamente diferenciações genéticas e morfológicas entre as populações.

7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados neste trabalho pode-se concluir que:

- Os 82 locos RAPD, analisados na matriz completa, indicaram um alto grau de estruturação da variabilidade genética, nas 11 populações de *Eupemphix nattereri*, do Brasil Central. Os coeficientes de Φ_{ST} , θ e θ^B estimaram um componente interpopulacional de aproximadamente 0,30;
- Não houve um padrão espacial claro da variabilidade genética, como evidenciado no teste de Mantel, correlacionando os valores de Φ_{ST} e as distâncias geográficas ($r=-0,02$; $P=0,48$, 1000 permutações). Não houve uma correlação significativa nem entre os locais mais próximos (menos de 50 km), indicando uma baixa dispersão para *Eupemphix nattereri*;
- Quanto às análises morfométricas, a primeira variável canônica (VC1) evidenciou diferenças entre as nove populações analisadas principalmente quanto aos caracteres CRC, LC e CC e a segunda variável canônica (VC2) em relação aos caracteres CF, CP e CT, sendo que as três variáveis apresentaram valores positivos, estando relacionadas a medidas dos membros.
- As correlações entre as matrizes de distância genética, morfométrica, geográfica, micro e macroambientais não foram significativas pelos testes de Mantel, entretanto houve tendências para uma correlação positiva ($r=0,35$; $P=0,08$) entre as variações morfológica e genética e uma correlação negativa entre variação morfológica e dados microclimáticos. Entretanto, não foram evidenciadas correlações estatisticamente significativas entre as matrizes de distância morfológica e os dados macroambientais. Desta forma, as nove

populações estudadas não apresentaram um padrão espacial, tanto para as distâncias genéticas quanto para as distâncias morfométricas.

- A análise de descontinuidade genética mostrou cinco barreiras entre as 11 populações analisadas, sendo 4 na região sudoeste do Estado e 1 na região leste. Este achado demonstrou que estas barreiras parecem estar associadas a efeitos de fragmentação de habitats, causando a extensa variabilidade populacional, como verificado pelos valores de Φ_{ST} de dois pares de populações localizadas entre as barreiras: Palmeiras e Colcalzinho ($\Phi_{ST} = 0,4114$) e Palmeiras e Cidade de Goiás ($\Phi_{ST} = 0,4092$).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alford RA & Richards SJ (1999) Global amphibian declines: a problem in applied ecology. *Ann Rev Ecol Syst* 30: 133-165.
- Almeida FS, Sodr e LMK & Contel EPB (2003) Population structure analysis of *Pimodolus maculatus* (Pisces, Siluriformes) from the Tietê and Paranapanema Rivers (Brazil). *Genetics and Molecular Biology* 26, 3, 301-305.
- AmphibiaWeb (2006) Information on amphibian biology and conservation. Berkeley: Calif rnia. Disponível em: <<http://amphibiaweb.org>>. Acesso em 01 de julho de 2006.
- Andersen LW, Fog K & Damgaard C (2004) Habitat fragmentation causes bottlenecks and inbreeding in the European tree frog (*Hyla arborea*). *Proceedings of Royal Society of London* 271, 1293-1302.
- Atchley WR; Rutledge JJ & Cowley DE (1982) A multivariate statistical analysis of direct and correlated response to selection in the rat. *Evolution* 36:677-698.
- Atkinson D (1996) Ectotherm life-history responses to developmental temperature. *In*: Johnston, I.A. & Bennett, A.F. eds. *Animals and temperature: phenotypic and evolutionary adaptation*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, p. 183-204.
- Augert D. & Joly P (1993) Plasticity of age at maturity between two neighbouring populations of the common frog (*Rana temporaria* L.). *Canadian Journal of Zoology* 71: 26-33.
- Avise JC (1994) *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman & Hall, New York.

- Ayres KL & DJ Balding (1998) Measuring departures from Hardy-Weinberg: a Markov chain Monte Carlo method for estimating the inbreeding coefficient. *Heredity* 80:769-777.
- Babik W & Rafinski J (2000) Morphometric differentiation of the moor frog (*Rana arvalis* Nilss.) in Central Europe. *Journal of Zoology and Systematic Evolutionary Research* 38, 239-24.
- Barbujani G, Magagni A, Minch E, Cavalli-Sforza LL (1997) An apportionment of human DNA diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94: 4516-4519.
- Batista CG (2001) Estrutura genética populacional de *Physalaemus cuvieri* Fitzinger, 1826 (Lissamphibia: Leptodactylidae) em fragmentos antrópicos e naturais de Cerrado. Dissertação de Mestrado (Biologia Animal), Universidade de Brasília, Brasília-DF.
- Bastos RP; Motta JAO, Lima LP & Guimarães LD (2003) Anfíbios da Floresta Nacional de Silvânia, Estado de Goiás. Stylo Gráfica e Editora, Goiânia.
- Beebe TJ & Rowe G (2004) *An introduction to Molecular Ecology*. Oxford University Press.
- Beebe TJ (2005) Conservation genetics of amphibians. *Heredity* 95(6):423-427.
- Beebe TJ C. 1996. *Ecology and conservation of amphibians*. London, Chapman & Hall. 214p.
- Beiguelman B (1994) Dinâmica dos genes nas famílias e nas populações. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética, 472pp.
- Bekessy SA, Allnut TR, Premolr AC, Lara A, Ennos RA, Burgnan MA, Cortes M e Newton AC (2002) Genetic variation in the vulnerable and endemic Monkey Puzzle tree, detected using RAPDs. *Heredity* 88: 243-249.

- Blaustein AR, Wake DB, and Sousa WP (1994) Amphibian declines: judging stability, persistence, and susceptibility of populations to local and global extinctions. *Conserv Biol* 8: 60-71.
- Blouin MS & Brown ST (2000) Effects of temperature-induced variation in anuran larval growth rate on head width and leg length at metamorphosis. *Oecologia* 125:358-361.
- Bos DH & Sites-Jr JW (2001) Phylogeography and conservation genetics of the Columbia spotted frog (*Rana luteiventris*; Amphibia, Ranidae). *Molecular Ecology* 10: 1499-1513.
- Brandão RA & Araújo AFB (1998) A herpetofauna da Estação Ecológica de Águas Emendadas. In: Marinho-Filho, Rodrigues F & Guimarães M (eds). Vertebrados da Estação Ecológica de Águas Emendadas. História Natural e Ecologia em um fragmento de cerrado do Brasil Central. SEMATEC/IEMA, Brasília, pp 9-21.
- Brasileiro CA.; Sawaya RJ; Kiefer MC. & Martins M (2005) Amphibians of an open cerrado fragment in southeastern Brazil. *Biota Neotropica* 5(2): 1-17. <http://www.biotaneotropica.org.br/v5n2/pt/abstract?article+BN0040522005>.
- Browne M & Mels G (2000) SYSTAT 10- Statistics 10 – Statistics II. SPSS Inc., Chicago.
- Burns EL, Eldridge MDB, and Houlden BA (2004) Microsatellite variation and population structure in a declining Australian hylid *Litoria aurea*. *Mol Ecol* 13: 1745-1757.
- Buskirk V. & Arioli M (2005) Habitat specialization and adaptive phenotypic divergence of anuran populations. *Genetics and Molecular Biology* 18: 596-608.

- Buso GSC, Rangel PH , and Ferreira ME (1998) Analysis of genetic variability of South American wild rice populations (*Oryza glumaepatula*) with isozymes and RAPD markers. *Mol Ecol* 7: 107-117.
- Camp C.; Marshall JL. & Austin RM (2000) The evolution of adult body size in black-bellied salamanders (*Desmognathus quadramaculatus* complex). *Canadian Journal of Zoology* 78: 1712-1722.
- Cardoso AJ, Andrade GV & Haddad CFB (1989) Distribuição espacial em comunidades de anfíbios (Anura) no SE do Brasil. *Rev. Brasil. Biol.*, 49:241-249.
- Castellano S. & Giacoma C (1998) Morphological variation of the green toad, *Bufo viridis*, in Italy: A Test of Causation. *Journal of Herpetology* 32(4): 540-550.
- Castellano S.; Giacoma C. & Dujsebayaeva T (2000) Morphometrical and advertisement call geographic variation in polyploid green toads. *Biological Journal of Linnean Society of London* 70: 341-360.
- Castellano S.; Rosso A.; Doglio S. & Giacoma C (1999) Body size and calling variation in the green toad *Bufo viridis*. *Journal of Zoology* 248: 83-90.
- Cavallari MM (2004) Estrutura Genética de Populações de *Encholirium* (BROMELIACEAE) e implicações para sua conservação. Dissertação de mestrado, Piracicaba, 92 p.
- Cei JM (1980) Amphibians of Argentina. *Italian Journal of Zoology* 2: 1-690.
- Cockerham CC; Weir BS Variance of actual inbreeding. *Theoretical Population Biology*, San Diego, v.23, n.1, p.85-109, 1983.
- Coelho ASG (2002) Abordagem Bayesiana na análise genética de populações utilizando dados de marcadores moleculares. Tese de doutorado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 80 pp.

- Colli GR, Bastos RP & Araújo AFB (2002) The character and dynamics of Cerrado herpetofauna. In *The Cerrados of Brazil: Ecology and Natural History of a Neotropical Savanna*. Columbia University Press, New York.
- Culver M, Johnson WE, Pecon-Slaterry J, O'Brien SJ (2000) Genomic ancestry of the american puma (*Puma concolor*) *Journal of Heredity* 91: 186-197.
- Cushwa WT & Medrano JF (1996) Applications of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay for genetic analysis of livestock species. *Animal Biotechnology* 7: 11-31.
- Degen B, Caron H & Bandou E. (2001) Fine-scale spatial genetic structure of eight tropical species as analysed by RAPDs. *Heredity* 87: 497-507.
- Diniz- Filho JAF & TELLES MPC (2002) Spatial Autocorrelation Analysis and the Identification of Operational Units for Conservation in Continuous Populations. *Conservation Biology*, v.16, n.4, p.924 – 935.
- Driscoll DA (1998) Genetic structure of the frogs *Geocrinia lutea* and *Geocrinia rosea* reflects extreme population divergence and range changes, not dispersal barriers. *Evolution* 52: 1147-1157.
- Duellman WE & Trueb L (1994) *Biology of Amphibians*. McGraw-Hill, Baltimore and London.
- Duellman WE (1988) Patterns of species diversity in anuran amphibians in the American Tropics. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 75: 79-104.
- Eizirik E, Kim J, Menotti-Raymond M, Crawshaw PG Jr, O'Brien SJ e Johnson WE (2001) Phylogeography, population history and conservation genetics of jaguars (*Panthera onca*, Mammalia, Felidae). *Molecular Ecology* 8: 1571-1584.
- Epperson BK (2003) *Geographical Genetics*. Princeton University Press, New Jersey.

- Eterovick PC; Carnaval ACOQ; Borges-Nojosa DM; Silvano DL & Segalla MV (2005) Amphibian Declines in Brazil: An Overview. *Biotropica* 37: 166-179.
- Excoffier L, Smouse PE and Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Ferreira ME, Grattapaglia D (1998) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3. ed., Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 220p.
- Fischer M, Husi R, Prati D (2000) RAPD variation among and within small and large populations of the rare clonal plant *Ranunculus reptans* (Ranunculaceae). *American Journal of Botany*, v. 87, p. 1128-1137.
- Friedl TWP & Klump M (1997) Some aspects of population biology in the European tree-frog, *Hyla aborea*. *Herpetologica* 53, 321-330.
- Frost (2006) Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 4 (17 August 2006). American Museum of Natural History, New York, USA. Disponível em: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php>.
- Funk WC, Greene AE, Corn PS, Allendor FW (2005) High dispersal in a frog species suggests that it is vulnerable to habitat fragmentation. *Biol Lett* 1-4. Disponível em: <http://www.royalsoc.ac.uk>
- Gabriel KR e Sokal RR (1969) A new statistical approach to geographic Variation Analysis. *Systematic Zoology*, Vol. 18, No. 3 pp. 259-278.
- Gamerman D (1997) Markov chain Monte Carlo: Stochastic simulation for Bayesian inference: Chapman and Hall, New York, USA, 1997.
- Garay J & Dias J (2001) Conservação da biodiversidade em ecossistemas tropicais, p:147-150. Petrópolis. Ed. Vozes.

- Gascon C, Loughheed SC & Bogart JP (1996) Genetic and morphological variation in *Vanzolinius discodactylus*: A test of the river hypothesis of speciation. *Biotropica* 28: 376-387.
- Gomez-Mestre I, Tejedo M (2004) Contrasting patterns of quantitative and neutral genetic variation in locally adapted populations of the natterjack toad, *Bufo calamita*. *Evolution* 2004 Oct. 58(10): 2343-2352.
- Gordon DA, Lattier DL, Silbiger RN, Torsella J, Wolff JO, Smith MK (1998) Determination of genetic diversity and paternity in the gray-tailed vole (*Microtus canicaudus*) by RAPD-PCR. *Journal of Mammalogy* 79 (2): 604-611.
- Goodrum J. The race FAQ (2002) Disponível em: <http://www.goodrumj.com/RaceFaq.html>. Data de acesso: 03/11/2006.
- Hadrys H, Balik M and Schierwater B (1992) Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol Ecol* 1: 55-63.
- Haig SM, Rhimer JM & Heckel DG (1994) Population differentiation in randomly amplified polymorphic DNA of red-cock-aded woodpeckers *Picoides borealis*. *Molecular Ecology* 3: 581-595.
- Hamrick JL (1982) Plant population genetics and evolution. *Am J Botany*, v.69, p.1685-1693.
- Hanski I (1998) Metapopulation dynamics. *Nature*, v. 396, 41-49 pp.
- Hardy OJ (2003) Estimation of pairwise relatedness between individuals and characterization of isolation-by-distance processes using dominant genetic markers. *Mol Ecol* 12: 1577-1588.
- Hartl D e Clark AG (1989) Principles of population genetics Sinauer Associates, Sunderland MA, 301 pp.

- Hassanien HA; Elnady M; Obeida A & Itriby H (2004) Genetic diversity of Nile tilapia populations revealed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *Aquaculture Research* 35: 587-593.
- Hedrick PW (2005) *Genetics of Populations* 3rd edition, Jones and Bartlett, EUA, 737pp.
- Hitchings SP & Beebee TJ (1997) Genetic substructuring as a result of barriers to gene flow in urban *Rana temporaria* (common frog) populations: implications for biodiversity conservation. *Heredity* 79 (2): 117-27.
- Holsinger KE (1999) Analysis of genetic diversity in geographically structured populations: a Bayesian perspective. *Hereditas* 130: 245-255.
- Holsinger KE and Lewis PO (2003) HICKORY v 1.0. Department of Ecology and Evolutionary Biology, The University of Connecticut. <http://www/eeb.uconn.edu/>
- Holsinger KE and Wallace LE (2004) Bayesian approaches for the analysis of population genetic structure: an example from *Platanthera leucophaea* (Orchidaceae). *Mol Ecol* 13: 887-894.
- Holsinger KE, Lewis PO e Dey DK (2002) A Bayesian method for analysis of genetic population structure with dominant marker data. *Mol Ecol* 11: 1157-1164.
- Hranitz JM e Diehl WJ (2000) Allozyme variation and population genetic structure during the life history of *Bufo woodhousii fowleri* (Amphibia: Anura). *Biochemical Systematic Ecology* 28, 15-27.
- Jorde LB, Watkins WS, Bamshad ML, Dixon ME, Ricker CE, Seielstad MT, Batzer MA (2000) The distribution of human genetic diversity: a comparison of mitochondrial, autosomal, and Y-chromosome data. *American Journal of Human Genetics* 66: 979-988.

- Juliano RF (2003) Variação geográfica, morfométrica e acústica em *Physalaemus cuvieri* FITZINGER, 1826 (Amphibia:Anura:Leptodactylidae) no Cerrado do Brasil Central. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
- Kim KS, Tanabe Y, Park CK e Ha JH (2001) Genetic variability in east asian dogs using microsattelite loci analysis. *The Journal of Heredity* 92: 398-403.
- Klink, C.A. 1995 De Grão em Grão: O Cerrado Perde Espaço. World Wide Fund for Nature (WWF-Brasil), Brasília. 66 p.
- Kraaijeveld-Smit FJL, Beebee TJC, Griffiths RA, Moore RD, e Schley L (2005) Low gene flow but high genetic diversity in the threatened Mallorcan midwife toad *Alytes muletensis*. *Mol Ecol* 14:3307-3315.
- Kyle CJ e Strobeck C (2001) Genetic structure of North American wolverine populations (*Gulo gulo*). *Molecular Ecology* 10: 337- 347.
- Lampert KP, Rand AS, Mueller UG e Ryan MJ (2003) Fine-scale genetic pattern and evidence for sex-biased dispersal in the túngara-frog, *Physalaemus pustulosus*. *Mol Ecol* 12: 3325-3334.
- Legendre P e Legendre L (1998) *Numerical Ecology*. Elsevier, Amsterdam.
- Lenzi-Mattos R, Antoniazzi MM; Haddad CFB; Tambourgi DV; Rodrigues MT. e Jared C (2005) The inguinal macroglands of the frog *Physalaemus nattereri* (Leptodactylidae): structure, toxic secretion and relationship with deimatic behaviour. *Journal of Zoological London* 266: 385-394.
- Li CC (1976) *Population Genetics*. Pacific Groove: Boxwood, 631p.
- Lynch M e Milligan BG (1994) Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3: 91-99.

- Madison DM & Farrand L (1998) Habitat use during breeding and emigration in radio implanted tiger salamanders, *Ambystoma tigrinum*. *Copeia*, 402-410.
- Malhotra A e Thorpe RS (1997) Size and shape variation in a Lesser Antillean anole, *Anolis oculatus* (Sauria: Iguanidae) in relation to habitat. *Biological Journal of Linnean Society of London* 60:53-72.
- Manly BFJ (1997) Randomization, bootstrap and Monte Carlo methods in Biology. Chapman & Hall, London.
- Martins OS (1988) Preservação e genética evolutiva. In: Encontro sobre Recursos genéticos. Jaoboticabal. Anais. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, p. 62-66.
- McDiarmid RW e Altig R (1999) Tadpoles: the Biology of Anuran Larvae. University of Chicago Press, Chicago.
- Meffe GK & Carrol CR (1997) Principles of Conservation Biology. 2a edição, Sinauer Associates, Sunderland.
- Méndez MA; Soto ER; Correa C, Veloso A; Vergara E; Sallaberry M. & Iturra P (2004) Morphological and genetic differentiation among Chilean populations of *Bufo spinulosus* (Anura: Bufonidae). *Revista Chilena de História Natural* 77:559-567.
- Merriam G & Wegner J (1992) Local extinctions, habitat fragmentation and ecotones. In Hansen AJ & Di Castri F (eds) Landscape boundaries: consequences for biotic diversity and ecological flows. *Ecological studies* 92, Springer-Verlag, New York, p. 150-169.
- Miller MP (1997) Tools for population genetic analyses (TFGPA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Software distribuído pelo autor.

- Mittermeier RA, Myers N, Thomsen JB, Fonseca GAB, Oliveri S (1998) Biodiversity hotspots and major tropical wilderness areas: approaches to setting conservation priorities. *Conservation Biology* 12: 516-520.
- Monteiro LR & Reis SF (1999) *Princípios de Morfometria Geométrica*. Holos Editora, Ribeirão Preto, 188 pp.
- Moraes PLR (1997) Estrutura genética de populações de *Cryptocarya moschata* Nees & Marthius Ex Nees (Lauraceae). Tese de doutorado, Piracicaba, SP, Universidade de São Paulo.
- Moravec J (1990) Postmetamorphic growth in the European treefrog (*Hyla arborea*). *Acta Universitatis Carolinae Geographica* 34: 359-370.
- Mueller UG, and LL Wolfenbarger (1999) AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends Ecol Evol*, 14: 389-394.
- Mullis KB & Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction *Methods Enzymol.* 155: 335-50.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.
- Nascimento LB, Caramaschi U and Cruz CAG (2005) Taxonomic Review of the Species Groups of the Genus *Physalaemus* Fitzinger, 1826. *Arq Mus Nac* 63: 297-320.
- Neff NA & Marcus LF (1980) *A Survey of Multivariate Methods for Systematics*. New York: privately published, 234 pp.
- Nei M (1977) F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided population. *Annals of Human Genetics*, v.41, p.225-233.

- Neveu H, Hafen T, Zimmerman E, Rumpler Y (1998) Comparison of the genetic diversity of wild and captive groups of *microcebus murinus* using the random amplified polymorphic DNA method. *Folia Primatology* 69: 127-133.
- Nevo E & Beiles A (1991) Genetic Diversity and Ecological Heterogeneity in Amphibian Evolution. *Copeia*, v. 1991, n.3, pp. 565-592.
- Newman RA and Squire T (2001) Microsatellite variation and fine-scale population structure in the wood frog (*Rana sylvatica*). *Mol Ecol* 10: 1087-1100.
- Newmann RA (1992) Adaptive plasticity in amphibian metamorphosis. *Bioscience* 42: 671-678.
- Nimer E (1989) *Climatologia do Brasil*. IBGE-SUPREN, 2ª edição. Rio de Janeiro.
- Paduan KS, Araújo-Jr JP & Ribolla PEM (2006) Genetic variability in geographical populations of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) in Brazil elucidated by molecular markers. *Genetics and Molecular Biology* 29 (2): 391-395.
- Paetkau D, Amstrup SC, Born EW, Calvert W, Derocher AE, Garner GW, Messier F, Stirling I, Taylor MK, Wiig SC (1999) Genetic structure of the world's polar bear populations *Molecular Ecology* 8: 1571-1584.
- Pakkasmaa S, Merilä J & O'Hara RB (2003) Genetic and maternal effect influences on viability of common frog tadpoles under different environmental conditions. *Heredity* 91, 117-124.
- Palo JU, Schmeller DS, Laurila A, Primmer CR, Kuzmin SL, Merila J (2004) High degree of population subdivision in a widespread amphibian. *Mol Ecol* 13(9): 2631-2644.
- Peakall R, Gilmore S, Keys W, Morgante M, Rafalski A (1998) Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats (SSRs) within the

- genus and other legume genera: implications for the transferability of SSRs in plants. *Mol Biol Evol* 15 (10): 1275-87.
- Platz JE and Grudzien TA (2003) Limited Genetic Heterozygosity and Status of Two Populations of the Ramsey Canyon Leopard Frog: *Rana subaquavocalis*. *J Herpetol* 37: 758-761.
- Rabouam C, Comes AM, Bretagnolle V, Humbert J-F, Periquets G & Bigot Y (1999) Features of DNA fragments obtained by random amplified polymorphic DNA (RAPD) assays. *Molecular Ecology* 8: 493-503.
- Rafinski J & Babik W (2000) Genetic differentiation among northern and southern populations of the moor frog *Rana arvalis* Nilsson in Central Europe. *Heredity* 84: 610-618.
- Randi E, Pierpaoli M, Beaumont M, Ragni B, Sforzi A (2001) Genetic identification of wild and domestic cats (*Felis silvestris*) and their hybrids using Bayesian clustering methods. *Molecular Biology and Evolution* 18: 1679-1693.
- Räsänen K; Laurila A & Merilä J (2003) Geographic variation in acid tolerance of the moor frog, *Rana arvalis* in local adaptation. *Evolution* 57: 352-362.
- Ratter JA; Ribeiro JF & Bridgewater S (1998) The Brazilian Cerrado vegetation and threats to its biodiversity. *Annals of Botany* 80: 223-230.
- Reis SF; Pessoa LM & Strauss RE (1990) Application of size-free canonical discriminant analysis to studies of geographic differentiation. *Revista Brasileira de Genética* 13: 509-520.
- Rissler LJ, Wilbur HM and Taylor DR (2004) The Influence of Ecology and Genetics on Behavioral Variation in Salamander Populations across the Eastern Continental Divide. *Am Nat* 164: 201-213.

- Rohlf FJ (1989) NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Exeter publishers, New York.
- Rosso A, Castellano S. & Giacoma C (2004) Ecogeographic analysis of morphological and life-history variation in the Italian frog. *Evolutionary Ecology Research* 18: 303-321.
- Rothermel BB & Semlitsch RD (2002) An experimental investigation of landscape resistance of forest versus old-field habitats to emigrating juvenile amphibians. *Conservation Biology* 16: 1324-1332.
- Roy MS, Gefen E, Smith D, Ostrander EA, Wayne RK (1994) Patterns of differentiation and hybridization in North American wolflike canids, revealed by analysis of microsatellite loci. *Molecular Biology and Evolution* 11: 553-570.
- Rowe G, and Beebee TJC (2004) Reconciling genetic and demographic estimators of effective population size in the anuran amphibian *Bufo calamita*. *Conserv Genetics* 5:287-298.
- Rowe G, Beebee TJC and Burke T (1998) Phylogeography of the natterjack toad *Bufo calamita* in Britain: genetic differentiation of native and translocated populations. *Mol Ecol* 7: 751-760.
- Rowe G, Beebee TJC and Burke T (2000) A microsatellite analysis of natterjack toad, *Bufo calamita*, metapopulations. *Oikos* 88: 641-651.
- Sazima I & Caramaschi U (1986) Descrição de *Physalaemus deimaticus*, sp. n., e observações sobre comportamento deimático em *Physalameus nattereri* (Steindachner) – Anura, Leptodactylidae. *Revista de Biologia* 13: 91-101.

- SBH (2005) Lista de espécies de anfíbios do Brasil. Sociedade Brasileira de Herpetologia (SBH). Disponível em: <http://www.sbherpetologia.org.br>. Acesso em 30/06/2006.
- Schäuble CS (2004) Variation in body size and sexual dimorphism across geographical and environmental space in the frogs *Limnodynastes tasmaniensis* and *L. Peronii*. Biological Journal of Linnean Society of London 82: 39-56.
- Sebben AM (2001) Estrutura Genética de Populações de Jequitibá-Rosa [*Cariniana legalis*] (Mart.) O. Ktze por caracteres quantitativos e isoenzimas. Tese de doutorado, Piracicaba, SP, Universidade de São Paulo.
- Seppä P & Laurilla A (1999) Genetic structure of island populations of the anurans *Rana temporaria* and *Bufo bufo*. Heredity 82: 309-317.
- Shaffer HB, Fellers GM, Magee A, Voss SR (2000) The genetics of amphibian declines: population substructure and molecular differentiation in the Yosemite toad, *Bufo canourus* (Anura, Bufonidae) based on single strand conformation polymorphism analysis (SSCP) and mitochondrial DNA sequence data. Mol Ecol 9:245-257.
- Sharma IK, Clements MA, Jones DL (2000) Observations of high genetic variability in the endangered Australian terrestrial orchid *Pterostylis gibbosa*. R Br (Orchidaceae) Biochemical Systematics and Ecology, v. 28, p. 651-663.
- Shoemaker J, Painter I & Weir BS (1998) A Bayesian Characterization of Hardy-Weinberg Disequilibrium. Genetics v. 149, 2079-2088.
- Silva APZ (1998) Estudos citogenéticos de anuros da família Leptodactylidae (Amphibia), com técnicas de coloração diferencial. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo.

- Silva JMC, Bates JM (2002) Biogeographic patterns and conservation in the South American cerrado: a tropical savanna hotspot. *BioScience* 52:225-233.
- Slatkin M (1987) The average number of sites separating DNA sequences drawn from a subdivided population. *Theoretical Population Biology*, v. 32, p.42-49.
- Smith MA & Green DM (2004) Phylogeography of *Bufo fowleri* at its northern range limit. *Mol Ecol* 13: 3723-3733.
- Sneath PHA & Sokal RP (1973) *Numerical Taxonomy*. WH Freeman and Company, San Francisco.
- Sokal RR & Rohlf FJ (1995) *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. 3a edição. W. H. Freeman and Co.: New York. 887 pp.
- Solé-Cava (2001) Biodiversidade molecular e genética da conservação. In Matioli SR (ed) *Biologia Molecular e Evolução*. Holos Editora, Ribeirão Preto.
- Soulé ME & Kohm KA (1989) *Research priorities for conservation biology*. Island Press.
- Spear SF, Peterson CR, Matocq MD, Storfer A (2005) Landscape genetics of the blotched tiger salamander (*Ambystoma tigrinum melanostictum*). *Mol Ecol* 14: 2553-2564.
- Spiegelhalter DJ, Best NG, Carlin BP and Linde VD (2002) Bayesian measures of model complexity. *J R Stat Soc [Series B]* 64: 483-689.
- Tansley SA & Brown CR (2000) RAPD variation in the rare and endangered *Leucadendron elimense* (Proteaceae): implications for their conservation. *Biological Conservation*, v. 95, p. 39-48.
- Telles MPC (2000) Diversidade genética e estrutura genética populacional de cagaitera (*Eugenia dysenteria* DC) do sudoeste de Goiás. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO.

- Telles MPC (2005) Estrutura Genética Populacional de *Physalaemus cuvieri* FITZINGER, 1826 (Anura: Leptodactylidae) e padrões de ocupação humana no Estado de Goiás. PhD Thesis, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
- Telles MPC, Bastos RP, Soares TN, Resende LV and Diniz-Filho JAF (2006) RAPD variation and population genetic structure of Barker frog *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leptodactylidae) in Central Brazil. *Genetica*, Holand v.124.
- Trakimas G; Matsui M; Nishikawa K. & Kasugai K (2003) Allozyme variation among Populations of *Rana pirica* (Amphibia: Anura). *Journal of Zoology Systematic Evolutionary Research* 41: 73-79.
- Valsecchi E, Palsboll P, Hale P, Glockner-Ferrari D, Ferrari D, Clapham P, Larsen F, Mattila D, Sears R, Sigurjonson J, Brown M, Corkern P, Amos B (1997) Microsatellite genetic distances between oceanic populations of the humpback whale (*Megaptera novaeangiae*). *Molecular Biology and Evolution* 14: 355-362.
- Van Hooft WF, Groen AF e Prins HHT (2000) Microsatellite analysis of genetic diversity in African buffalo (*Syncerus caffer*) populations throughout Africa. *Molecular Ecology* 9: 2017-2025.
- Vogel F & Motulsky AG (2000) *Genética Humana: Problemas e Abordagens*. 3ª edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 684p.
- Von Eggeling, FV & Spielvogel H (1995) Applications of random PCR. *Cellular and Molecular Biology* 41: 653-670.
- Wagner RS, Miller MP, Crisafulli CM & Haig SM (2005) Geographic variation, genetic structure, and conservation unit designation in the Larch Mountain salamander (*Plethodon larselli*). *Can J Zool* 83: 396-406.

- Weir BS (1996) Genetics data analysis II: methods for discrete population genetic data. Sunderland : Sinauer Associates, 455 p.
- Wells KD (1977) The social behaviour of anuran amphibians. *Animal Behaviour* 25: 666-693.
- Welsh J and McClelland M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary oligonucleotides. *Nucleic Acid Res* 18: 7213-7218.
- Whitlock MC & Macauley DE (1999) Indirect measures of gene flow and migration: $F_{st} \approx 1/(4Nm + 1)$. *Heredity* 82, 117-125.
- Wilbur HM (1997) Experimental ecology of food webs: complex systems in temporary ponds. *Ecology* 78: 2279-2302.
- Wilcox BA & Murphy DD (1985) Conservation Strategy: The Effects of Fragmentation on Extinction. *American Naturalist* 125 (6): 879-887.
- Wilczynsky W & Ryan MJ (1999) Geographic variation in animal communication systems. In: Foster A & Endler J (eds) *Geographic Variation in Behavior- Perspectives on Evolutionary Mechanisms*. Oxford University Press, Oxford, New York, pp 231-234.
- Williams JGW, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA & Tingey SV (1990) DNA Polymorphisms amplified by arbitrary oligonucleotides are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.
- Wilson AJ, Hutchings JA and Ferguson MM (2004) Dispersal in a stream dwelling salmonid: inferences from tagging and microsatellite studies. *Conserv Genetics* 5, 25-37.
- Wright S (1978) *Evolution and the Genetics of populations vol. 4. Variability within and among natural populations* Univ. Chicago Press, Chicago, Illinois, 439 pp.

- Wright S (1965) The interpretation of population structure by F-statistic with special regard to systems of mating. *Evolution*, v.19, p.395-420.
- Wu X-B, Wang Y-Q, Zhou K-Y, Zhu W-Q, Nie J-S, Wang C-L, Xie W-S (2002) Genetic variation in captive population of chinese alligator, *Alligator sinensis*, revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Biol Conserv* 106: 435-441.
- Young B, Lips KR, Reaser JK, Ibáñez R, Salas AW, Credeño JR, Coloma LA, Ron S, Marca Ela, Meyer JR, Muñoz A, Bolaños F, Chaves G, Romo D (2001) Population declines and priorities for Amphibian conservation in Latin America. *Conserv Biol* 15: 1213-1223.
- Zeisset I & Beebee TJC (2003) Population genetics of a successful invader: the marsh frog *Rana ridibunda* in Britain. *Mol Ecol* 12: 639-646.
- Zhang D-X & Hewitt GG (2003) Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Mol Ecol* 12: 563-584.
- Zucchi MI (2002) Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR. Tese de doutorado, Piracicaba, 130p.