

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Instituto de Biociências

Departamento de Genética

Laboratório de Citogenética e Evolução Molecular

Projeto de Trabalho de Conclusão de Curso:

DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DO *SAPITO DE DARWIN*, *MELANOPHRYNISCUS MONTEVIDENSIS* (ANURA, BUFONIDAE).

Aluna: Bruna Elenara Szynewski

Orientador: Thales Renato Ochotorena de Freitas

Co-orientadores: Mayara Delagnelo Medeiros e Jorge Sebastião Bernardo-Silva

Comissão de Graduação de Ciências Biológicas

Porto Alegre, Novembro de 2016



MAS O CACHORRO CUIDA DA CASA! É COMPANHEIRO NOS PASSEIOS, NA ALEGRIA E NA TRISTEZA!



beckillustras@gmail.com

*Dedico à minha vó,
quem foi essencial na minha vinda à UFRGS,
e que agora não está mais presente fisicamente.*

Agradecimentos

Esses agradecimentos não se restringem a um semestre de TCC, afinal foram quatro anos trabalhando com esse *'sapito'*, e os agradecimentos a 'família' Citogenética e Evolução ou melhor, ao Lab Tucão, são enormes. Queria poder agradecer a cada um que seja pela ajuda fazendo um PCR ou apenas pelo incentivo moral (o mais importante no trabalho, sem dúvidas) tornaram esse projeto em um Trabalho de Conclusão de Curso. Queria agradecer a todos que passaram por mim nesses quatro anos, os mais antigos Dani, Grazi, Pati, Gisele (por mandar eu tirar férias e pelos conselhos de vida, obrigada!). Aos que ainda estão aqui: Lucinha, Leo, Renan, Bruno, Borges, William, Bruna, Brenda, Érika, Rafa1, Rafa2, Keila, Cris, Marcelo e Luiz. As girls do lab Luiza, Carol S., Sandra, Thamara e Mayara. A Paula por ter me ajudado com o abstract e a Pri e a Cris Jacobi por terem feito esse mapa lindo. Ao Lu por fazer os reagentes com a maior pressa, claro, sempre com alguma condição que envolvia alguma recompensa, que no fim das contas nunca vinha. Ao meu orientador Thales e co-orientador Jorge pela orientação do trabalho. Gostaria de agradecer imensamente à Mayara, não só pela cuidadosa revisão do trabalho mas principalmente por me ensinar desde a usar uma pipeta até mexer nos programas mais tenebrosos que já vi. A minha família, por todo apoio mesmo não entendendo até hoje o que faço, afinal, como explicar o que é um PCR para teu vô. Queria agradecer em especial todas as amigas e amigos não só do laboratório mas que a vida me proporcionou conhecer, por cada palavra de incentivo, por cada abraço, por cada 'tu tá bem?', por cada 'vaaaai tcc', por cada 'tu precisa de ajuda?' Sair do interior a mais de 500km da capital para fazer Biologia não seria fácil se vocês não tornassem meus dias mais felizes! Obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
INTRODUÇÃO	8
OBJETIVO GERAL	12
Objetivos Específicos	12
1. Amostragem	13
2. Extração de DNA	15
3. Amplificação dos Fragmentos de Microssatélite e Genotipagem	15
4. Análise de Dados	16
RESULTADOS	17
DISCUSSÃO	21
1. Aplicação dos marcadores de microssatélite	21
2. Diversidade Genética	22
3. Índice de Endogamia	24
4. Estruturação e Diferenciação Populacional	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

RESUMO

Conhecido como sapinho da barriga vermelha ou *sapito de Darwin*, *Melanophryniscus montevidensis* ocorre entre o município de Santa Vitória do Palmar, RS, até Montevidéu no Uruguai. Está classificado na lista da IUCN como vulnerável e na lista vermelha do estado do Rio Grande do Sul (2014) e lista nacional do Uruguai como em perigo (2012), suas populações estão em declínio e seu habitat é fragmentado. O estudo da diversidade genética possibilita a caracterização das populações e a criação de formas mais efetivas para a preservação das espécies, uma ferramenta utilizada para isso são marcadores moleculares como os microssatélites. Dessa forma o objetivo desse trabalho foi de avaliar a diversidade e estruturação genética presente nas populações de *M. montevidensis*, ao longo de sua distribuição. Neste trabalho foram utilizadas 79 amostras distribuídas em nove populações, duas populações localizadas no Brasil e sete populações localizadas no Uruguai. Utilizamos nove *primers* descritos para *M. dorsalis*. Os PCRs seguiram o protocolo desenvolvido para *M. dorsalis*. Foi analisado a diversidade alélica, heterozigosidade observada, heterozigosidade esperada, presença de alelos nulos e gargalo populacional. Também o desequilíbrio de ligação e equilíbrio de Hardy-Weinberg. Foi calculado os índices de F_{ST} , F_{IS} e F_{ST} par a par e a estruturação populacional. Dos nove *loci* utilizados no trabalho, oito puderam ser utilizados em análises de todas as populações, um *locus* teve de ser excluído pois apresentou difícil identificação dos alelos. Seis *loci* apresentaram alelos nulos, e quatro *loci* ficaram fora do EHW para ao menos uma população. A média da diversidade alélica variou de 2,86 à 8,14 alelos por *locus*. A heterozigosidade observada variou de 0,52 a 0,83 enquanto que a esperada de 0,68 a 0,88. O índice de endogamia variou de 0,03 à 0,47, com o valor médio de 0,20. A AMOVA mostrou que a maior parte da diferenciação genética está entre indivíduos e não entre populações, os valores de F_{ST} também foram baixos sugerindo uma baixa diferenciação populacional. Além disso, o melhor *k* inferido pela estruturação populacional foi o *k* igual a um. Duas populações mostraram indícios de gargalo populacional. A diversidade alélica encontrada nos oito *loci* de microssatélites nas populações de *M. montevidensis* foi considerável, levando em conta a diversidade alélica presente nas populações de *M. dorsalis* que tinham números populacionais similares. Os alelos nulos são um problema recorrente em trabalhos com microssatélites, eles podem estar relacionados aos índices de endogamia e ter causado o desequilíbrio de Hardy-Weinberg de alguns dos *loci*. As duas populações que apresentaram indícios de gargalo merecem atenção pois eventos de gargalo por várias gerações pode levar à extinção de populações. Bem como, os níveis elevados de endogamia preocupam pois podem levar à diminuição do *fitness* das populações. Não houve diferenciação nem estruturação entre as populações, provavelmente por existir fluxo gênico entre elas. Portanto, esse trabalho mostrou que há uma diversidade genética significativa em *M. montevidensis* observada através dos valores moderados a altos de diversidade alélica e que não há estruturação entre as populações. No entanto os indícios de gargalo e os altos índices de endogamia são preocupantes e carecem monitoramento para conservar esta espécie mundialmente ameaçada.

ABSTRACT

Known as the red belly toad or ‘sapito de Darwin’, *Melanophryniscus montevidensis* occurs from the municipality of Santa Vitória do Palmar, RS, to Montevideo in Uruguay. The species is classified as vulnerable in the IUCN Red List of Threatened Species and as endangered in the Red List of the State of Rio Grande do Sul (2014) and the National List of Uruguay (2012). Its populations are in decline and their habitat is fragmented. Studying genetic diversity allows us to characterize populations and create more effective ways of preserving species, molecular markers such as microsatellites are useful in the study of populations. Thus, the objective of this work is to evaluate the diversity and genetic structure present in the populations of *M. montevidensis*, throughout its distribution. The present study used 79 samples, distributed over nine populations, two of which located in Brazil and seven in Uruguay. Nine primers described for *M. dorsalis* were used. The PCRs followed the protocol developed for *M. dorsalis*. Allelic diversity, observed and expected heterozygosity, presence of null alleles and population bottleneck were analyzed, as well as linkage disequilibrium and Hardy-Weinberg equilibrium (HWE). The F_{ST} , F_{IS} and pairwise F_{ST} indices were calculated the population structure. Of the nine loci used in the study, eight could be used in analyzes of all populations, one locus had to be excluded because the alleles could not be clearly identified. Six loci had null alleles, and four loci showed deviations from HWE for at least one population. The mean allelic diversity ranged from 2.86 to 8.14 alleles per locus. The observed heterozygosity varied from 0.52 to 0.83 while the expected one ranged from 0.68 to 0.88. The inbreeding index ranged from 0.03 to 0.47, with a mean value of 0.20. AMOVA showed that most of the genetic differentiation is between individuals and not between populations, the F_{ST} values were also low suggesting a low population differentiation. In addition, the best k inferred by population structure was k equal to one. Two populations showed signs of a population bottleneck. The allelic diversity found in the eight microsatellite loci in the populations of *M. montevidensis* was considerable, taking into account the allelic diversity in populations of *M. dorsalis* with similar population numbers. Null alleles are a recurrent problem in works with microsatellites, they may be related to inbreeding rates and might have caused Hardy-Weinberg imbalance of some of the loci. The two populations that showed signs of bottlenecks deserve attention because bottleneck events over several generations may lead to the extinction of populations. The high levels of inbreeding are also alarming because they can lead to a decrease of the population fitness. There was no differentiation or structuring among populations, probably due to high gene flow between them. Therefore, this work showed that there is a significant genetic diversity in *M. montevidensis* observed through moderate to high values of allelic diversity and that there is no structuring among populations. However, indications of bottleneck and high inbreeding rates are worrying and require monitoring to conserve this worldwide threatened species.

INTRODUÇÃO

A ordem Anura é a ordem com o maior número de espécies e de ecologia mais diversificada dentro da Classe Amphibia (POUGH, 2008). Os girinos são indicadores da qualidade ambiental pela filtragem de partículas orgânicas e algas que, em desequilíbrio, poderiam gerar processos eutróficos em ecossistemas aquáticos (SMITH, 2001). Grupos ápice de cadeias alimentares, como os anuros, participam do controle ativo de níveis tróficos inferiores, atuando assim na estabilidade dos sistemas ecológicos (DEL-CLARO e TOREZAN-SILINGARDI, 2006).

A região neotropical compreende a mais rica fauna de anfíbios anuros do mundo (DUELLMAN, 1990). A grande maioria das espécies de anfíbios anuros da região Neotropical é reconhecida por apresentar marcada sazonalidade reprodutiva, cuja maior frequência geralmente coincide com os períodos de maior pluviosidade, especialmente nas regiões tropicais da América do Sul (BERNADETE, 2007). Muitas espécies, inclusive, apresentam reprodução explosiva, sendo encontradas em atividade apenas durante poucos dias (MORATO, 2014).

Os anfíbios apresentam diversas características fisiológicas e comportamentais que os tornam altamente vulneráveis às modificações do habitat (MORATO, 2001). As populações de anfíbios estão em declínio no mundo todo, entre os fatores causadores desse declínio estão a perda e a fragmentação de hábitat, aquecimento global e invasão por espécies exóticas (BECKER, et. al., 2007).

A família de anuros mais ameaçada em número de espécies é a família Hylidae porém, outros grupos como a família Bufonidae também correm riscos. Dentro da família Bufonidae encontra-se o gênero *Melanophryniscus* Gallardo, 1961. Este gênero inclui 26 espécies de sapos que se distribuem do sudoeste do Brasil até o Uruguai, centro e norte da Argentina, Paraguai e sul da Bolívia (FROST, 2014). Trabalhos de filogenia indicam que *Melanophryniscus* é grupo irmão de todas as outras espécies de bufonídeos (FROST et al., 2006; PYRON e WIENS, 2011). As características mais notáveis do gênero são as cores chamativas, comportamento de reflexo 'unken' (Kwet et al., 2005) uma rápida metamorfose e a presença de compostos alcaloides que os indivíduos obtêm através da dieta composta de artrópodes (LANGONE, 1994). A maioria das espécies do gênero possui também reprodução explosiva (Kwet et al., 2005)

na qual após grandes períodos de chuvas os indivíduos migram para poças temporárias e se reproduzem.

Melanophryniscus montevidensis (PHILIPPI, 1902) se distingue das outras espécies do gênero por apresentar manchas amarelas na lateral do corpo (LANGONE, 1994) (Figura 1). A variação da coloração é bastante grande, característica não só dessa espécie como das outras do gênero, tanto que é possível a identificação individual pelo padrão da coloração (ELGUE et al., 2014).



Figura 1: Foto mostrando um espécime de *M. montevidensis* com coloração característica à espécie.

Sua distribuição vai da costa do Rio da Prata e Oceano Atlântico no Uruguai até a cidade de Santa Vitória do Palmar, RS, Brasil (KLAPPENBACH e LANGONE, 1992; BERNARDO-SILVA et al., 2012) (Figura 2). A espécie, assim como as outras do gênero, possui reprodução explosiva. Este sapinho-da-barriga-vermelha está classificado na lista da IUCN (2004) como vulnerável, Lista Vermelha do Estado do Rio Grande do Sul como em perigo (2014) e na lista nacional do Uruguai como em perigo (CARREIRA e MANEYRO, 2012).



Figura 2: Distribuição geográfica da espécie *M. montevidensis* segundo a IUCN (2016).

Os estudos de modelagem de nicho de *M. montevidensis* realizado por Bernardo-Silva et al. (2012) indicam duas áreas prioritárias para a conservação da espécie. Uma situa-se no Departamento de Canelones e outra no Departamento de Maldonado, ambas no Uruguai. No Departamento de Canelones, onde há grande favorecimento ambiental ao “sapito de Darwin”, não há registro da espécie há vários anos sendo que alguns pesquisadores já o consideram extinto neste local (MANEYRO e LANGONE, 2001). A outra área prioritária para a conservação localiza-se no Departamento de Maldonado, onde há registros regulares de ocorrência da espécie, inclusive ações de conservação já vêm sendo implantadas (BERNARDO-SILVA et al., 2012). Como as populações de *M. montevidensis* podem ter sido extintas no Departamento de Canelones é de grande urgência a criação de medidas de proteção na área de Maldonado.

Assim como para as outras espécies de anuros, as pressões sobre o “sapito de Darwin” incluem fragmentação e perda de hábitat (TORANZA e MANEYRO, 2013). A planície costeira, local de ocorrência endêmica da espécie, está em constante

degradação por loteamentos imobiliários que causam um grande impacto sobre todos os ecossistemas da planície costeira (BURGER e RAMOS, 2006). As ameaças para *M. montevidensis* são o aquecimento global (TORANZA e MANEYRO, 2013) e a potencial contaminação com o fungo causador da quitridiomicosose (*Batachochytrium dendrobatidis*), pois já há o relato de contaminação de anuros que ocorrem em simpatria com *M. montevidensis* com o respectivo fungo (CRAWFORD et al., 2010).

Além de todas estas pressões e ameaças que põem em risco a sobrevivência das populações do “sapito de Darwin”, outra barreira na conservação de suas populações é a falta de conhecimento da sua ecologia e biologia. As espécies de anuros que possuem modo de vida como *M. montevidensis* são conspícuas, o que inviabiliza os estudos ecológicos e os levantamentos de biodiversidade (SILVANO e PIMENTA, 2003). Trabalhos de levantamento de dados observados em campo podem ser de difícil realização. Em contraponto ferramentas genéticas podem ser muito úteis para o estudo de espécies que apresentam modos de vida como *M. montevidensis*.

Algumas das ameaças como fragmentação do hábitat podem causar isolamento de populações e barreiras ao fluxo gênico, fazendo com que em longo prazo haja uma diminuição da variabilidade genética e por seguinte diminuição no "fitness" (ALLENDORF e LUIKART, 2007). Por isso a análise da variabilidade genética é essencial para saber o status de conservação das populações de uma espécie. Informações sobre a variabilidade genética são úteis na formação de planos de manejo, direcionando atenção às populações que estão com variabilidade genética baixa ou altos índices de endogamia e, portanto ocorrem mais risco de extinção (FRANKHAM et al., 2008).

Já foi realizado um trabalho molecular com esta espécie, porém o trabalho utilizou marcadores mitocondriais como o *Cytb* e COI (BERNARDO-SILVA, 2012). A rede de haplótipos de *M. montevidensis* gerada pelo trabalho sugere que há uma expansão demográfica e alta variabilidade genética. Porém marcadores mitondriais evidenciam um perfil genético mais antigo, pois se comparados por exemplo com marcadores microssatélites possuem uma taxa de mutação mais lenta (FRANKHAM et al., 2008). Dessa forma microssatélites são úteis na análise de eventos históricos mais recentes (PENHA e VIEIRA, 2007).

Microssatélites são uma das ferramentas mais utilizadas em genética de populações, são sequências simples repetidas (SSRs), as quais consistem de 1 a 6 nucleotídeos repetidos *in tandem* (LI et al., 2002). Os microssatélites possuem um alto polimorfismo, decorrente das altas taxas de mutação nestes *loci*. São flanqueados por sequências únicas e por isso podem ser amplificados através de PCR, o que faz deles ótimos marcadores moleculares para a compreensão sobre estruturação recente das populações (PENHA e VIEIRA, 2007).

Os marcadores moleculares como microssatélites são úteis no estudo de parâmetros como a diversidade genética, o grau de cruzamento aleatório e o fluxo gênico (FRANKHAM et al., 2008). E, como possuem elevadas taxas de polimorfismo, possibilitam o acesso a informações genéticas recentes.

OBJETIVO GERAL

Avaliar a diversidade e estruturação genética presente nas populações de *Melanophryniscus montevidensis*, ao longo de sua distribuição.

Objetivos Específicos

1. Avaliar o sucesso da amplificação cruzada dos primers descritos para *M. dorsalis* em *M. montevidensis*;
2. Analisar a variabilidade genética presente nas populações de *M. montevidensis* através de índices como diversidade alélica, heterozigosidade observada e heterozigosidade esperada;
3. Verificar possíveis barreiras ao fluxo gênico e gargalos de garrafa;
5. Através dos dados de variabilidade e estruturação genética gerar informações para utilização em planos de manejo e conservação da espécie globalmente ameaçada *M. montevidensis*.

METODOLOGIA

1. Amostragem

As amostras utilizadas no respectivo trabalho foram obtidas para a realização do trabalho de doutorado de Bernardo-Silva (2012) junto ao programa de pós-graduação em Ecologia (PPGECO UFRGS) e foram usadas neste trabalho de forma independente do trabalho anterior. As amostras estão depositadas no Laboratório de Citogenética e Evolução no Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

A localização aproximada das populações é mostrada na Figura 3. São 79 amostras distribuídas em nove populações como mostra a Tabela 1.

Tabela 1: Localidade das populações, número amostral e ano da sua coleta.

<u>Localidade</u>	<u>População</u>	<u>N</u>	<u>Ano da coleta</u>
Santa Vitória do Palmar, BRA	SAVI	5	Nov 2010
Chuí, BRA	CHUI	21	Jun 2009
La Coronilla, URY	LACO	14	Mar 2004
Cerro Verde, URY	CEVE	3	Out 2007
Cabo Polônio, URY	CAPO	20	Mar 2004
Rocha, URY	LAPE	2	Fev 2004
Rocha, URY	LARO	2	Ago 2002
Rocha, URY	BAIN	2	Jan 2004
Rocha, URY	PERO	10	Jan 2004

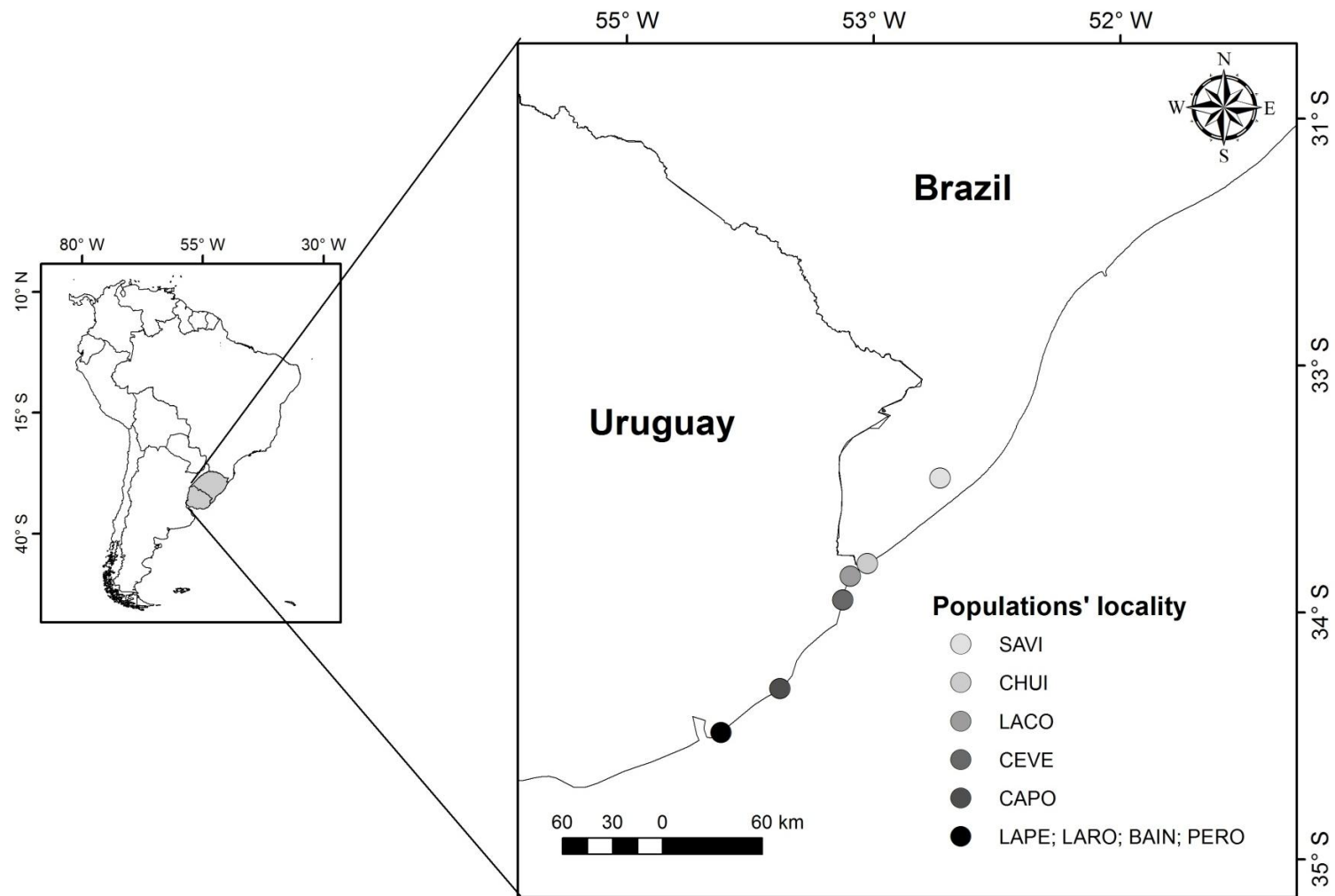


Figura 3: Mapa das Localidades amostradas das Populações de *M. montevidensis* no sul do Brasil (Rio Grande do Sul) e Uruguai.

2. Extração de DNA

A extração do material genético (DNA) foi feita de acordo com a técnica de CTAB (DOYLE e DOYLE, 1987) a partir de fragmentos de pele, músculo ou fígado. A concentração e a qualidade do material genético extraído foi medida no aparelho NanoDrop® 1000 (Uniscience). As amostras foram então diluídas a uma concentração de 10 ng/μl e armazenadas a -20°C.

3. Amplificação dos Fragmentos de Microssatélite e Genotipagem

O desenvolvimento de marcadores microssatélites tem um custo alto e a transferibilidade de *primers* entre espécies relacionadas, ou seja, de mesma família, e mais precisamente do mesmo gênero neste caso, pode ser uma alternativa para redução destes custos (SILVA et al., 2013). Por isso, para a amplificação dos fragmentos de microssatélite de *M. montevidensis* foram utilizados nove pares de *primers* descritos para *M. dorsalis* (MEDEIROS, 2014). Os *primers* utilizados foram Medo1, Medo2, Medo3, Medo4, Medo5, Medo6, Medo7, Medo8 e Medo9.

As condições da Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR) foram as mesmas utilizadas para a amplificação dos fragmentos de *M. dorsalis* com eventuais modificações. Na Reação em Cadeia da Polimerase padrão foi usado um terceiro *primer* universal M13 junto com uma das três fluorescências FAM, HEX ou NED, e uma cauda M13 no *primer forward*, segundo metodologia de Schuelke (2000). No Mix da PCR foi usado 40 ng de DNA, 1x PCR tampão, 4mM de MgCl₂, 8 pmol do *primer reverse* e M13, 2 pmol do *primer forward*, 0,4 mM de dNTP, 1U de Taq DNA polimerase (Ludwing Biotec) e 0,5 μL de BSA (*Bovine serum albumin*, 10 mg/ml). A reação total foi de 20 μL.

O PCR foi realizado no termociclador, com os seguintes ciclos de temperatura: 94° por 5 minutos, 30 ciclos de 94° por 30 segundos, temperatura média de anelamento do primer (53°-62°) por 45 segundos e 72° por 45 segundos, seguido por 8 ciclos para o anelamento da cauda M13 de 94° por 30 segundos, 53° por 45 segundos e 72° por 45 segundos, e uma extensão final de 72° por 10 minutos. A temperatura média de cada *primer* foi a mesma usada no protocolo desenvolvido para *M. dorsalis*, sendo que para

algumas amostras que não amplificaram com esta temperatura, ela foi diminuída para um ou dois graus abaixo da temperatura inicial estabelecida.

Após a amplificação dos fragmentos via PCR, os mesmos foram verificados em gel de Poliacrilamida não-desnaturante 6% para saber se a amplificação foi realizada com sucesso e sem contaminação por amostras exógenas. A genotipagem foi realizada pela empresa sul-coreana Macrogen no sequenciador automático ABI3100.

4. Análise de Dados

O tamanho dos alelos gerados pela amplificação foi visualizado no programa *Peak Scanner Software* (Applied Biosystems). A presença de alelos nulos, no programa *Micro-checker* (VANOOSTERHOUT et al., 2004) com 95% de intervalo de confiança e 1000 replicações. O teste para verificação de gargalos de garrafa realizado no programa *Bottleneck* (CORNUET e LUIKART, 1996) utilizando os modelos de mutação SMM (*Stepwise mutation model*; KIMURA e OHTA, 1978) e TPM (*Two-phase model*; DI RIENZO et al., 1994). Para o modelo TPM foi utilizado o parâmetro padrão de 70% de SMM. Para verificar a significância foi observado o valor de p do teste de Wilcoxon para excesso e deficiência de heterozigosidade. O programa Arlequin (EXCOFFIER et al., 2005) foi usado para a análise de diversidade genética, para o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) com 10.000 cadeias de Markov Monte Carlo (MCMC) e 1.000 replicações no teste de desequilíbrio de ligação (DL). O valor de p foi ajustado através da correção de Bonferroni (RICE, 1989) para ambos os testes.

O mesmo programa foi utilizado para calcular os demais índices de diversidade genética como o número de alelos, heterozigosidade observada e heterozigosidade esperada. Além do F_{ST} , F_{IS} , F_{ST} par a par com 10100 permutações. A AMOVA gerada pelo programa Arlequin foi executada a nível individual, calculado o F_{IS} de cada população com 10.000 permutações. E a estruturação populacional no programa *Structure* (PRITCHARD et al., 2000), com 10 rodadas independentes e um k de 1 à 9.

Foram utilizadas duas abordagens Bayesianas para analisar a estrutura genética e atribuir grupos entre as amostras. O programa *Structure* (PRITCHARD et al., 2000) foi definido com dez rodadas independentes para cada k, variando de 1 a 9 com 1.000.000 de interações para MCMC e 500.000 interações de burn-in assumindo o modelo de miscigenação. A primeira análise foi feita com frequências independentes de alelos,

enquanto que a segunda foi realizada com frequências alélicas correlacionadas. Foram definidas corridas com o modelo LOCPRIOR, que incorpora informação populacional *a priori*. Este modelo permite uma melhor performance onde existe poucos *loci* como também poucos indivíduos, ou valores não suficientes de divergência (HUBISZ et al. 2009). Para inferir o melhor número de grupos (k) das amostras, foi utilizado o maior valor de *likelihood*, de acordo com Pritchard (2000). Strucutre Harvester (DENT e VONHOLDT 2012), bem como Clumpp (JAKOBSSON e ROSENBERG 2007) e Distruct (ROSENBERG 2004) foram utilizados para gerar os gráficos de estruturação genética.

RESULTADOS

Os nove *loci* descritos para *M. dorsalis* amplificaram e se mostraram polimórficos nas populações de *M. montevidensis*. Porém o *locus* Medo5 apresentou vários picos aglomerados na maioria das populações, dificultando a identificação dos verdadeiros alelos, por isso, teve que ser excluído das análises. Apenas na população CHUI foi possível identificar com clareza os alelos amplificados pelo Medo5.

No teste de desequilíbrio de ligação os pares Medo2 e Medo3 apresentaram desequilíbrio de ligação apenas na população LACO, após correção de Bonferroni (RICE, 1989).

O *locus* Medo1 apresentou alelos nulos para as populações CHUI, CAPO e LACO. O Medo3 para CHUI e CAPO. O Medo4 para LACO. O Medo7 para CHUI. O Medo8 para CHUI, PERO, CAPO e LACO. E o Medo9 para PERO. Apenas os *loci* Medo2 e Medo6 não apresentaram alelos nulos para nenhuma das populações.

A média da diversidade alélica variou de 2,86 à 8,14 alelos por *locus* nas populações. A diversidade alélica foi diretamente proporcional ao número de indivíduos amostrados em cada população. A heterozigosidade observada variou de 0,42 a 0,83 enquanto que a heterozigosidade esperada de 0,68 a 0,88. O *locus* Medo1 ficou fora do EHW em duas populações, os *loci* Medo3 e Medo7 em uma população e o *locus* Medo8 em três populações. O índice de endogamia variou de 0,03 à 0,47, como mostra a Tabela 2.

Tabela 2: Populações e seus respectivos números amostrais (N). Diversidade genética mostrada através da média de alelos (A), Heterozigosidade observada (Ho) e Heterosigosidade esperada (He). *Loci* fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg em cada população (EHWD) e índice de endogamia de cada população (Fis).

População	N	A	Ho	He	EHWD*	Fis
CHUI	20	7,62	0,5318	0,6827	Medo7, Medo8	0,2188**
SAVI	5	4,37	0,6208	0,7442	-	0,0316
PERO	10	6,25	0,5680	0,7517	Medo8	0,1912**
LARO	2	3,00	0,8333	0,8333	-	0,0000
LAPE	2	2,86	0,7857	0,8809	-	0,0000
BAIN	2	3,14	0,7142	0,8333	-	0,2000
CAPO	20	8,14	0,6367	0,8052	Medo1,3,8	0,1891**
LACO	14	6,62	0,5219	0,7512	Medo1,8	0,2753**
CEVE	3	3,42	0,4286	0,7333	-	0,4705

*Após correção de Bonferroni (RICE, 1989)

**Valores significativos ($p < 0,05$)

Os resultados da AMOVA indicaram que 76% da diferenciação está entre indivíduos, 21% entre indivíduos da mesma população e apenas 3% entre as populações. O valor de F_{IT} foi de 0,24 ($p < 0,05$) e o F_{IS} de 0,21 ($p < 0,05$). O F_{ST} foi de 0,030 ($p < 0,05$) e o F_{ST} par a par teve valores baixos como mostra a Tabela 3.

Tabela 3: Valores de F_{ST} par a par entre as populações.

	CHUI	SAVI	PERO	LARO	LAPE	BAIN	CAPO	LACO	CEVE
CHUI	-								
SAVI	0,0689*	-							
PERO	0,0646*	0,08086*	-						
LARO	0,1461*	0,1526	0,0872	-					
LAPE	0,1295*	0,1244	0,0145	0,0667	-				
BAIN	-0,0075	0,0576	0,0337	0,2157	0,1478	-			
CAPO	0,0333*	0,0419	0,0309*	0,0393	0,0678	-0,0161	-		
LACO	0,0544*	0,0191	0,0143	0,0778	0,0749	-0,0076	0,0199	-	
CEVE	0,0055	0,0326	0,0862	0,2036	0,1794	-0,0470	0,0069	0,0502	-

*Valores significativos ($p < 0,05$).

Devido às exigências feitas pelo programa Bottleneck, o teste de gargalo de garrafa foi feito somente para populações que apresentavam um número amostral maior que dez. O teste indicou excesso de heterozigotos apenas no modelo T.P.M para a população LACO. Deficit de heterozigotos do modelo S.M.M. na população CHUI. E na população CAPO os dois modelos indicaram dados opostos, enquanto que o modelo T.P.M indicou excesso de heterozigotos o modelo S.M.M. indicou déficit de heterozigotos. Na população PERO não se encontrou nenhuma evidência de gargalo.

O melhor k inferido pelo programa Structure foi um, o qual foi o valor de k com maior *likelihood* e menor desvio padrão (Figura 4). Isso indica que as populações de *M. montevidensis* são similares entre si como mostra a Figura 5, e não estão estruturadas, provavelmente devido ao fluxo gênico. As figuras 6 e 7 mostram a análise para k2 e k9 que continuam não evidenciando estruturação nas populações com o aumento dos *clusters* confirmando que o k1 é o que melhor responde ao conjunto de dados.

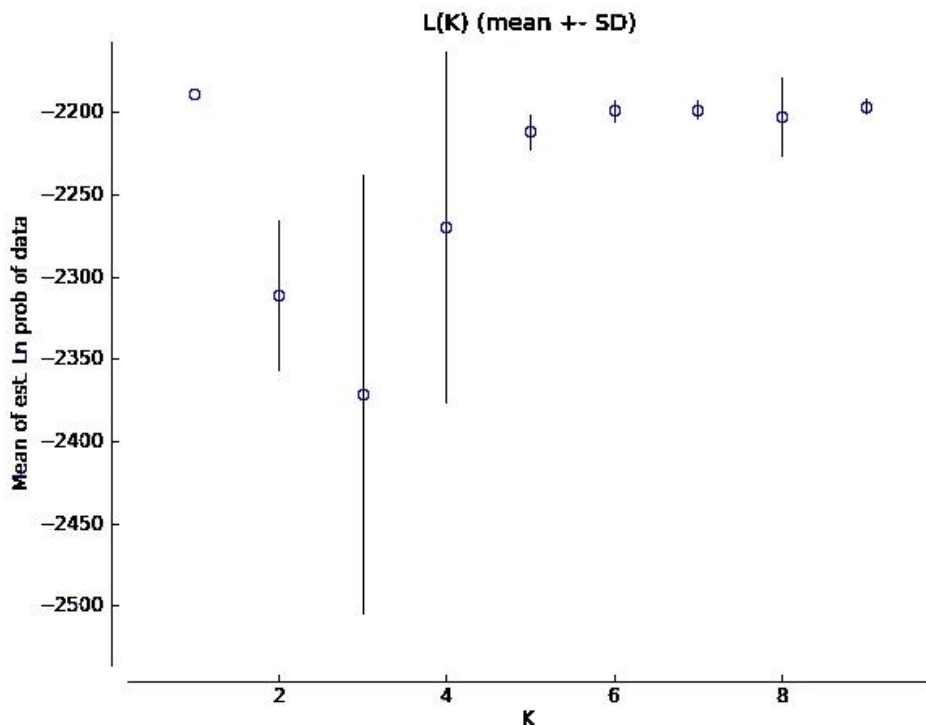


Figura 4: Gráfico apresentando os valores de *likelihood* e desvio padrão para os diferentes K's analisados (k=1 à k=9).

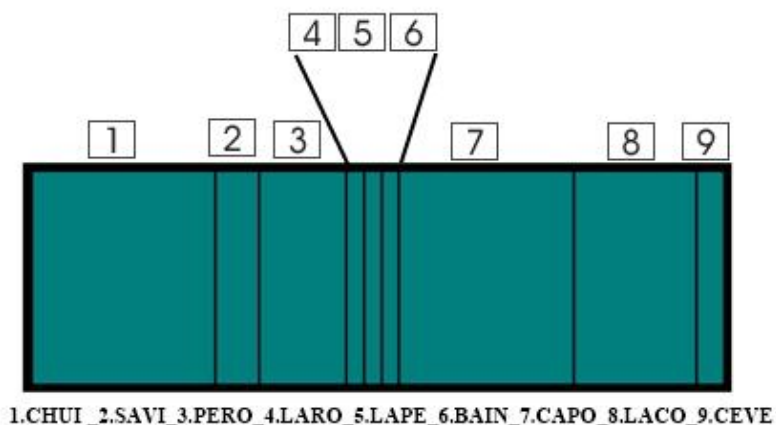


Figura 5: Gráfico de estruturação gênica gerado pelo programa Structure para o melhor K ($k=1$), de acordo com o maior valor de likelihood apresentado anteriormente.

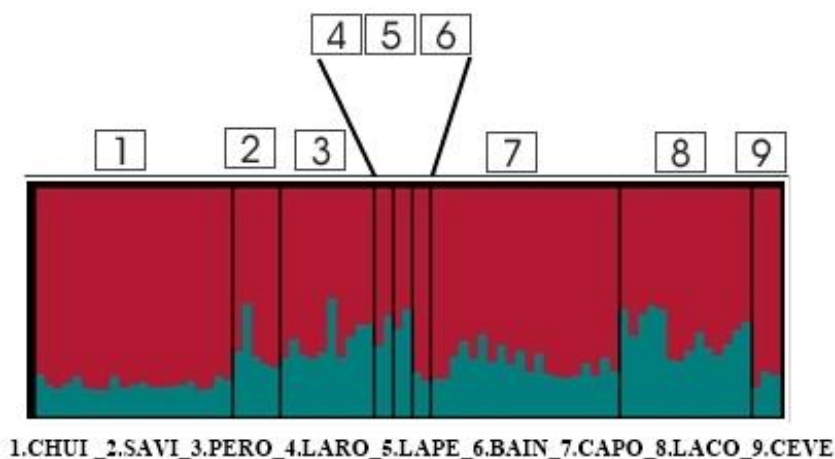


Figura 6: Demonstração da falta de estruturação gerada para a análise bayesiana quando testado dois clusters genéticos ($K=2$).

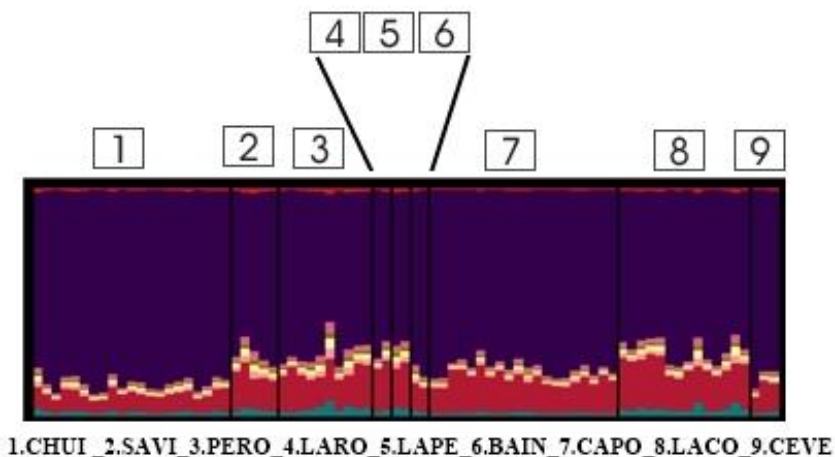


Figura 7: Demonstração da falta de estruturação gerada para a análise bayesiana quando foi testado nove clusters genéticos ($K=9$).

DISCUSSÃO

1. Aplicação dos marcadores de microssatélite

O isolamento e caracterização de *loci* de microssatélites requer recursos financeiros e tempo disponível. Torna-se mais rápido, fácil e barato a utilização de marcadores microssatélites previamente isolados e caracterizados para espécies filogeneticamente próximas (SILVA, 2013). O sucesso na amplificação cruzada varia entre os diferentes táxons. E em ‘répteis’, aves e mamíferos o sucesso da amplificação cruzada em espécies do mesmo gênero é alto (BARBARA et al., 2007).

Em geral a amplificação cruzada tem mais êxito em animais do que em plantas (BARBARA et al, 2007). Neste trabalho oito dos nove *loci* de microssatélites previamente descritos para *M. dorsalis* apresentaram uma boa amplificação em *M. montevidensis*, servindo para a análise genética das populações. Mesmo após várias mudanças no protocolo de PCR, o Medo5 teve que ser excluído devido à dificuldade na identificação de seus alelos na maioria das populações. Esse *locus* de microssatélite não deve ser excluído de estudos populacionais dessa espécie ou mesmo de outras espécies, pois teve um bom resultado para uma população de *M. montevidensis*. Além disso, será feito ainda um refinamento no protocolo de PCR a fim de otimizar a amplificação dos alelos nesse *locus* e facilitar a identificação dos resultados da genotipagem.

Quando um conjunto de microssatélites é isolado e caracterizado para uma espécie e aplicado numa espécie filogeneticamente próxima esperamos encontrar uma diversidade de alelos menor devido aos *loci* utilizados não serem específicos. Porém as populações de *M. montevidensis* apresentaram uma diversidade de alelos similar as de *M. dorsalis*. Inclusive algumas populações de *M. montevidensis* tiveram maior diversidade alélica do que todas as populações de *M. dorsalis* analisadas no trabalho de Medeiros, (2014). A população com maior diversidade genética de *M. dorsalis* foi a população de Arambaré com 20 indivíduos amostrados e com uma média de 6,44 alelos por *locus*. Três das nove populações de *M. montevidensis* apresentaram diversidade alélica superior à população mais diversa de *M. dorsalis*.

Logo, o presente trabalho demonstra que os microssatélites descritos para *M. dorsalis* apresentaram também amplificação nas populações de *M. montevidensis*. E,

podem ser usados no estudo de genética das populações de *M. montevidensis*, bem como, serem testados para utilização em outras espécies do gênero *Melanophryniscus*.

2. Diversidade Genética

As populações de *M. montevidensis* apresentaram de 2,86 à 8,14 alelos por *locus* com uma média de 4,7 alelos por *locus*. A variação tão grande no número de alelos se deve ao número amostral de cada população. Populações que apresentavam poucos indivíduos como LARO, LAPE, BAIN (N=2) mostraram um baixo número de alelos (3,0; 2,86; e 3,14 respectivamente). Portanto nessas populações com um N muito baixo a diversidade genética está bastante subestimada.

A diversidade alélica encontrada nos oito *loci* de microssatélites nas populações de *M. montevidensis* foi considerável, levando em conta a diversidade alélica presente nas populações de *M. dorsalis* que tinham números populacionais similares. BESSA-SILVA et al (2008) estudaram a diversidade genética em espécies da mesma família que *M. montevidensis* como *Rhinella marina*, esta espécie apresentou 8,5 alelos por *locus*, sendo bem superior que em *M. montevidensis*. Porém, cabe ressaltar que *R. marina* é uma espécie com status de conservação pouco preocupante, tem populações grandes, é de grande porte de comparada com *M. montevidensis* e em alguns locais inclusive, é exótica e invasora (MACIEL, 2008). Além disso, *M. montevidensis* está restrito a faixa litorânea enquanto que a espécie *R. marina* é florestal e tem menos limitações para dispersão. Como o teste de desequilíbrio de ligação apresentou significância entre os pares Medo2 e Medo3 apenas na população LACO enquanto nas outras oito populações estes *loci* não indicaram estar ligados é plausível que estes *loci* realmente não estejam ligados. Não foi encontrada nenhuma ligação entre os *loci* nas populações de *M. dorsalis* (MEDEIROS, 2014), o que corrobora que realmente não há ligação entre nenhum dos pares de microssatélite.

Houve presença de alelos nulos em seis dos oito *loci*. Estudos populacionais com o uso de marcadores de microssatélites enfrentam um problema de alelos nulos, isto é, a ausência de um produto de PCR, causado pelas mutações nas regiões flangeadoras de microssatélites e levando a falsa homozigose em indivíduos heterozigotos (KORDICHEVA et al, 2010). Nas populações de *M. dorsalis* apenas dois dos nove *loci* apresentaram alelos nulos (Medo1 e Medo3), os mesmos apresentaram alelos nulos em *M. montevidensis*.

Os alelos nulos causam uma superestimação de homozigotos e subestimação de heterozigotos. Porém outro fator genético que causa um aumento no número de homozigotos e diminuição do número de heterozigotos é o cruzamento entre parentes, a endogamia. Como a endogamia leva a desequilíbrios nas proporções genotípicas, populações que apresentam níveis elevados de endogamia apresentam frequências alélicas fora do EHW (FRANKHAM et al., 2008).

Com os resultados podemos observar que cinco dos seis *loci* que apresentaram alelos nulos também ficaram fora do EHW para ao menos uma das populações. E que os únicos dois *loci* que não apresentaram alelos nulos (Medo2 e Medo6) não ficaram fora do EHW para nenhuma das populações. Ao mesmo tempo alelos nulos também fazem com que *loci* fiquem fora do EHW. Por isso, para saber se os indivíduos identificados como homozigotos são verdadeiramente homozigotos seria necessário a aplicação de outros pares de *primers* para estes *loci* (KORDICHEVA et al, 2010). Porém, no momento, pares de *primers* adicionais não estão disponíveis para fazer uma segunda análise de cada *locus* que apresenta alelos nulos.

Outro fator que pode levar a perda de heterozigotos é o gargalo populacional por várias gerações (FRANKHAM et al., 2008). Os resultados dados pelo modelo T.P.M no programa Bottleneck indicam gargalo populacional na população LACO, enquanto o modelo S.M.M. indica gargalo na população CHUI. Na população CAPO não é possível saber se houve um gargalo populacional, pois os dois modelos indicaram informações opostas. Enquanto que o modelo T.P.M indicou excesso de heterozigotos, o modelo S.M.M indicou déficit de heterozigotos.

Alelos são perdidos, especialmente os raros, e as frequências dos alelos são distorcidas nas populações submetidas ao gargalo (FRANKHAM et al., 2008). Nessas populações que apresentam gargalo (LACO e CHUI) eventos como a perda de hábitat ou eventos catastróficos naturais podem ter causado a diminuição populacional e perda de diversidade genética, por isso essas populações carecem de monitoramento, pois eventos de gargalo por várias gerações podem levar à extinção de populações (FRANKHAM et al., 2008).

3. Índice de Endogamia

O F_{IS} , índice de endogamia, apresentou valores significativos para metade das populações. A média das populações foi de 0,20 sendo um valor moderado e que carece atenção. A endogamia é de profunda importância na biologia da conservação, uma vez que ela leva a reduções na heterozigosidade. Uma grande consequência prática da endogamia é que os homozigotos para os alelos recessivos deletérios tornam-se mais frequentes do que em populações que se reproduzem ao acaso. Uma vez que populações naturalmente exogâmicas contêm alelos deletérios (na maioria das vezes parcialmente recessivos) em frequências baixas, a endogamia aumenta os riscos de expor esses alelos nos homozigotos (FRANKHAM et al., 2008).

A depressão por endogamia pode ser comum na natureza, refletindo tanto a falha de estratégias de evitar endogamia como a tolerância à endogamia quando evitá-la é oneroso (HUCHARD et al., 2016). Fatores como a baixa dispersão dos organismos pode levar com que haja cruzamento entre indivíduos aparentados. Nos ratos-toupeira-pelado por exemplo, há uma baixa dispersão dos filhotes fazendo com que eles fiquem no grupo familiar e quando adultos reproduzam com parentes elevando os índices de endogamia (ROSS-GILLESPIE et al., 2007). Por ser de pequeno porte, provavelmente *M. montevidensis* tenha uma baixa dispersão, que pode se refletir no índice de endogamia.

Outra característica da biologia desta espécie e que pode estar relacionada aos índices moderados de endogamia é seu modo reprodutivo. A reprodução ocorre durante todo ano, após grandes chuvaradas (KWET et al., 2005). A chuva funciona como um gatilho, que quando acionado faz com que os sapos migrem para as lagoas com água (lagoas permanentes ou temporárias).

Pouco se sabe sobre aspectos reprodutivos mais específicos da reprodução deste sapo. Dessa forma, não sabemos se esta espécie possui mecanismos de identificar indivíduos aparentados e evitar cruzamento com tais. O fato de ocorrer uma reprodução explosiva após eventos de chuva pode influenciar nos índices de endogamia, LESBARRÈRES (2003) estudou *Rana dalmatina*, que apresentava níveis elevados de endogamia e uma das suas hipóteses era de que a espécie poderia ter um sistema reprodutivo complexo onde nem todos os machos adultos tinham acesso à reprodução.

No trabalho de LESBARRÈRES (2003) são usadas duas populações de *Rana dalmatina*, uma população sem impacto antrópico e outra situada à beira de uma rodovia. O índice de endogamia foi maior na população situada perto da rodovia ($F_{IS} = 0,544$) do que na população não impactada ($F_{IS} = 0,315$) ressaltando que impactos antrópicos podem causar distúrbios populacionais que causam um aumento nos índices de endogamia.

4. Estruturação e Diferenciação Populacional

Os dados gerados pelas análises da AMOVA apontam que há uma baixa diferenciação entre as populações, sendo que apenas 3% da diferenciação ocorre entre as populações. A maior diferenciação é intrapopulacional, ou seja, entre os indivíduos de uma mesma população. Os resultados do Structure corroboram com as informações geradas pela AMOVA, pois o melhor k inferido foi o k igual a 1. Isso significa que não há estruturação genética nas populações de *M. montevidensis* estudadas neste trabalho.

A mutação seguida de seleção e a deriva genética são forças que causam a diferenciação entre as populações. Enquanto que a migração homogeneiza as populações (FRANKHAM et al., 2008). Portanto, como não há estruturação entre as populações, provavelmente há um alto fluxo gênico entre elas, causada pela migração. A migração é possível em cenários onde as populações estão próximas o bastante e não há barreiras ao fluxo gênico. Para manter o fluxo gênico entre população não são necessários muitos migrantes, FRANKHAM (2008) diz que apenas um migrante por geração é suficiente para manter o fluxo gênico e não deixar que as populações se diferenciem.

CONCLUSÃO

O primeiro passo para a conservação de uma espécie é ter conhecimento sobre ela. Mas algumas espécies não são fáceis de serem observadas em campo, ou de serem utilizadas para trabalhos ecológicos (SILVANO e PIMENTA, 2003). Para estes casos a ferramenta molecular é muito útil. *Melanophryniscus montevidensis*, assim como as outras espécies do gênero, é difícil de ser encontrado em campo, os sapos deste gênero geralmente só aparecem na época reprodutiva. A coleta de alguns indivíduos e a análise molecular pôde elucidar informações sobre a biologia desta espécie e que podem ser usadas na conservação dela.

Neste trabalho podemos ver que os *primers* descritos para *M. dorsalis* podem ser utilizados nas populações de *M. montevidensis* e serem usados para estudos de genética populacional. As populações de *M. montevidensis* deste trabalho apresentaram diversidade genética considerável, com um bom número de alelos se comparado à espécie para qual os *primers* foram descritos, e a única dentro do gênero que possui estudos de genética populacional, *M. dorsalis*.

Além de apresentar uma diversidade alélica significativa, a análise de oito *loci* de microssatélites indica que não há estruturação entre as populações de *M. montevidensis*. A partir disso, supomos que há um alto fluxo gênico entre as populações que pode estar relacionado às curtas distâncias entre as populações e a ausência de barreiras ao fluxo gênico.

Apesar disso, alguns dados gerados pelo trabalho são preocupantes do ponto de vista genético para a conservação desta espécie. Os altos índices de endogamia podem levar a longo prazo a expressão de alelos deletérios e a diminuição do *fitness* dessas populações. Assim como a evidência de gargalo em duas populações merece monitoramento, pois eventos de gargalo podem levar populações à extinção devido à perda de diversidade genética.

O *sapito de Darwin*, listado como ameaçado em duas listas nacionais e como vulnerável mundialmente é endêmico da faixa litorânea que se estende do sul do Brasil até o departamento de Montevideo no Uruguai (KLAPPENBACH e LANGONE, 1992). Ele ocorre num ambiente que vem sendo cada vez mais impactado por ações antrópicas, a perda de habitat é, senão a principal, umas das principais pressões sob essa espécie. Vem causando declínios populacionais e até mesmo extinção local da espécie. Hoje, o sapo que leva o nome de Montevideo não ocorre mais lá, e não é só lá. Há muito tempo não se encontra mais esta espécie no departamento de Canelones, local onde há um grande favorecimento ambiental como relatado pelo trabalho de BERNARDO-SILVA e colaboradores (2012).

Nosso trabalho mostra que *M. montevidensis* tem uma diversidade genética significativa, mas ao mesmo tempo o relato de extinções locais da espécie junto com a evidência de gargalo para duas populações preocupa. A função da genética da conservação é de preservar as espécies como entidades dinâmicas, capazes de evoluírem

para adaptarem-se às mudanças ambientais (FRANKHAM et al., 2008). Portanto, o momento de ações para conservação da espécie é agora.

Agora, aonde as populações do *sapito de Darwin* ainda resguardam diversidade e são capazes de responderem às mudanças ambientais. Espero que as informações geradas pelo trabalho possam ser usadas a fim da conservação da espécie, afinal, não podemos esquecer: extinção é para sempre.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLENDORF FW e LUIKART G (2007) **Conservation and Genetic Populations**. Editora Blackwell Publishing. Capítulo 1 página 11-14.
- BARBARA T, PALMA-SILVA C, PAGGI GM, BERED F, FAY FM & LEXER C (2007) **Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations**. *Molecular Ecology*, v.16, p.3759-3767, 2007.
- BECKER CG, FONSECA CR, HADDAD CFB, BATISTA RF e PRADO PI (2007) **Habitat Split and the Global Decline of Amphibians**. *Science* 318:1775-1777.
- BERNARDE PS (2007) **Ambientes e temporada de vocalização da anurofauna no Município de Espigão do Oeste, Rondônia, Sudoeste da Amazônia-Brasil (Amphibia: Anura)**. *Biota Neotropica* 7 (2): 87-92.
- BERNARDO-SILVA J, MARTINS-FERREIRA C, MANEYRO R, FREITAS TRO (2012) **Identification of Priority Areas for Conservation of Two Endangered Parapatric Species of Red-bellied Toads Using Ecological Niche Models and Hotspot Analysis**. *Brazilian Journal of Nature Conservation* 10:207–213.
- BERNARDO-SILVA JS (2012) **História evolutiva e conservação de duas espécies de sapinhos-da-barriga-vermelha *Melanophryniscus dorsalis* e *Melanophryniscus montevidensis***. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012. Tese de doutorado- Programa de Pós-graduação em Ecologia.
- BESSA-SILVA AR, CUNHA DB, SODRÉ D, ROCHA TJO, SCHENEIDER H, SAMPAIO I, SEQUEIRA F, VALLINOTO M **Development and characterization of microsatellite loci for *Rhinella marina* (Amphibia, Bufonidae) and their transferability to two closely related species**. *Conservation Genet Resour* (2015) 7: 247.
- BURGER MI e RAMOS RA (2000) **Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Mata Atlântica e Campos Sulinos**. Ministério do Meio Ambiente/SBF Seção I, Capítulo 4. Áreas importantes para conservação na Planície Costeira do Rio Grande do Sul. Brasília, 2000.
- CARREIRA S e MANEYRO R (2012) **Guía de Anfíbios del Uruguay**. Editora: Ediciones de la Fuga. Primeira edição. Página 50-51. 2012.
- CORNUET JM, LUIKART G (1996) **Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data**. *Genetics* 144:2001-2014.
- CRAWFORD AJ, LIPS KR, BERMINGHAM E (2010) **Epidemic disease decimates amphibian abundance, species diversity, and evolutionary history in the highlands of central Panama**. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:13777–82.

- DEL-CLARO K e TOREZAN-SILINGARDI HM (2006) **Comportamento animal, interações ecológicas e conservação.** Pp. 399-410. In: *Biologia da Conservação: Essências.* São Carlos: RiMa.
- DI RIENZO A, PETERSON AC, GARZA JC, VALDES AM, SLATKIN M, FREIMER NB (1994) **Mutational processes of simple sequence repeat loci in human populations.** *Proc Natl Acad Sci USA* 91:3166-3170.
- DOYLE JJ, DOYLE JL (1987) **A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue.** *Phytochemical Bulletin* 9(1):11-15.
- DUELLMAN WE (1990) **Herpetofaunas in Neotropical Rainforests: Comparative composition, History, and Resource Use.** In: Gentry, A. (Ed.). *Four Neotropical rainforests.* New Haven: Yale University Press. p. 455-505.
- EARL DA, & VONHOLDT BM **STRUCTURE HARVESTER: A Website And Program For Visualizing STRUCTURE Output And Implementing The Evanno Method** *Conservation Genet Resour* (2012) 4: 359.
- ELGUE E, PEREIRA G, ACHAVAL-COPPE F, MANEYRO R (2014) **Validity Of Photo-Identification Technique To Analyse Natural Markings In *Melanophryniscus montevidensis* (Anura: Bufonidae).** *Phyllomedusa* 13, 59-66, 2014.
- EXCOFFIER L, LAVAL G, SCHNEIDER S (2005) **Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis.** *Evolutionary Bioinformatics* 1:47-50.
- FRANKHAM R, BALLOU JD, BRISCOE DA (2008) **Fundamentos de genética da conservação.** Sociedade Brasileira de Genética, 2008.
- FROST DR (2014) ***Melanophryniscus atroluteus*. Amphibian Species of the World: an Online Reference.** Version 6.0. American Museum of Natural History, New York, USA. Consultado em 12 de julho de 2016.
- FROST DR, GRANT T, FAIVOVICH J, BAIN RH, HAAS A, HADDAD CFB (2006) **The amphibian tree of life.** *Bull Am Mus Nat Hist.* 2006; 297:1–370.
- GUILLOT G, SANTOS F, ESTOUP A (2008) **Analysing georeferenced population genetics data with Geneland: a new algorithm to deal with null alleles and a friendly graphical user interface.** *Bioinformatics* 24(11):1406-1407.
- HUBISZ MJ, FALUSH D, STEPHENS M, PRITCHARD J (2009) **Inferring Weak Population Structure With The Assistance Of Sample Group Information.** *Mol Ecol Resour.* 2009 Sep; 9(5): 1322–1332.
- HUCHARD E, SCHLIEHE-DIECKS S, KAPPELER PM, KRAUS C (2016) **The inbreeding strategy of a solitary primate, *Microcebus murinus*.** *J Evol Biol.* 2016.
- IUCN 2016. **IUCN Red List of Threatened Species.** Version 2016.1. <www.iucnredlist.org>. Acesso em 01 de agosto de 2016.

JAKOBSSON M, ROSENBERG NA (2007) **CLUMPP : a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure**. *Bioinformatics* 23:1801–1806.

KIMURA M, OHTA T (1978) **Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population**. *Proc Natl Acad Sci* 75:2868-2872.

KLAPPENBACH MAE LANGONE JA (1992) **Lista sistemática y sinonímica de los anfibios del Uruguay con comentarios y notas sobre su distribución**. *Anales del Museo Nacional de Historia Natural de Montevideo*: 163-222.

KORDICHEVA SY; RUBTSOVA GA, SHITOVA MA, SHAIKHAEV GO, AFANASIEV KI, ZHIVOTOVSKY LA **A search for null alleles at the microsatellite locus of chum salmon (*Oncorhynchus keta walbaum*)**. *Russian Journal of Genetics*, v.46, p.1019-1022, 2010.

KWET A, MANEYRO R, ZILLIKENS A, and MEBS D (2005) **Advertisement calls of *Melanophryniscus dorsalis* (Mertens, 1933) and *M. montevidensis* (Philippi, 1902), two parapatric species from southern Brazil and Uruguay, with comments on morphological variation in the *Melanophryniscus stelzneri* group (Anura: Bufonidae)**. *Salamandra* 41 (1/2): 1-18.

LANGONE JA (1994) **Ranas y Sapos del Uruguay (reconocimiento y aspectos biológicos)**. Museo Zoológico Municipal Dámaso Antonio Larrañaga, Serie Divulgación página 1-123.

LESBARRÈRES D, PAGANO A, LODÉ T (2003) **Inbreeding and road effect zone in a Ranidae: the case of Agile frog, *Rana dalmatina* Bonaparte, 1840**. *C R Biologues* . 2003 Aug;326 Suppl 1:S68-72.

LI YC, KOROL AB, FAHIMA T, BEILES A, NEVO E (2002) **Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review**. *Molecular Ecology*, v.11, p.2453-2465. 2002.

LISTA DA FAUNA SILVESTRE DO RIO GRANDE DO SUL AMEAÇADOS DE EXTINÇÃO(2014). Acesso em 01 de agosto de 2016. Disponível em: www.fzb.rs.gov.br/upload/2014090911580809_09_2014_especies_ameacadas.pdf

MACIEL NM (2008) **Sistemática e Biogeografia do grupo *Rhinella marina* (Linnaeus, 1758) (Anura: Bufonidae)**. Tese de doutorado, Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Fisiológicas, Pós-graduação em Biologia Animal, Brasília 2008.

MANEYRO R e LANGONE JA (2001) **Categorización de los anfibios del Uruguay**. – Cuadernos de Herpetología 2/15:107–118.

MEDEIROS MD (2014) **Desenvolvimento de Marcadores Microsatélites e sua Aplicação em Populações de *Melanophryniscus dorsalis* (Anura: Bufonidae)**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014. Tese de doutorado- Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular.

MORATO SAA (2014) **Ferramentas para Avaliação de Impactos Ambientais e Planejamento de Unidades de Conservação: Grupos bioindicadores e sua análise mediante Índices de Similaridade Biológica e Análise de Parcimônia de**

Endemismos (PAE), In: Ana María Giménez; Graciela Inés Bolzón. (Org.). Educación e Investigación Forestal para un Equilibrio Vital. Cooperación Binacional Argentina - Brasil 1ed.Santiago del Estero: UNSE, 2014, v. , p. 165-200.

PENHA HA e VIEIRA MLC (2007) **Microssatélites: origem, evolução e papel no genoma dos eucariotos**. Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas – Seminários em Genética e Melhoramento de Plantas.

POUGH FH, JANIS CM e HEISER, JB (2008) **Salamandras, anuros e cecílias. In: A vida dos vertebrados**. 4. ed. São Paulo: Atheneu. pp. 220-263.

PRITCHARD JK, STEPHENS M, DONNELLY P (2000) **Inference of population structure using multilocus genotype data**. Genetics 155:945–959.

PYRON RA, WIENS JJ (2011) **A large-scale phylogeny of Amphibia with over 2,800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and cecilians**. Mol Phylogenet Evol. 2011; 61:543–583.

RICE W.R (1989) **Analyzing tables of statistical tests**. Evolution 1989;43:223–225.

ROSENBERG NA (2004) **Distruct: a program for the graphical display of population structure**. Molecular Ecology Notes 4:137-138.00

ROSS-GILLESPIE A, O'RIAIN MJ, KELLER LF (2007) **Viral epizootic reveals inbreeding depression in a habitually inbreeding mammal**. Evolution. 2007 Sep;61(9):2268-73.

SILVA MFN (2013) **Transferibilidade de Primers Microssatélites de *Phaseolus vulgaris* para *Vigna unguiculata***. Anais eletrônicos do III CONAC, Recife, PE. 5p. 2013.

SILVA, MFN **Transferibilidade de Primers Microssatélites de *Phaseolus vulgaris* para *Vigna unguiculata***. Anais eletrônicos do III CONAC, Recife, PE. 5p. 2013.

SILVANO DL e PIMENTA BVS (2003) **Diversidade e distribuição de anfíbios na Mata Atlântica do Sul da Bahia**. Corredor de Biodiversidade na Mata Atlântica do Sul da Bahia. CD-ROM, Ilhéus, IESB/CI/CABS/UFMG/UNICAMP.

SMITH GR (2001) **Effects of acute exposure to a commercial formulation of glyphosate on the tadpoles of two species of anurans**. Bulletin of the Environmental and Contamination Toxicology 67: 483-488.

TORANZA C e MANEYRO R (2013) **Potential effects of climate change on the distribution of an endangered species: *Melanophryniscus montevidensis* (Anura: Bufonidae)**. Phyllomedusa, São Paulo, 12(2): 97-106, 2013.

VANOOSTERHOUT C, HUTCHINSON WF, WILLS DPM et al. (2004) **MICROCHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data**. Molecular Ecology Notes 4:535-538.