

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS INSTITUTO DE BIOLOGIA

Mônica Conte

Desenvolvimento de microssatélites e análise populacional de espécies

de Physalaemus do grupo "cuvieri" (Anura, Leiuperidae)

Este	exe	mplar	corre	sponde	àr	edação	final
da t	ese	defei <u>.: Ca</u>	ndida	pelo(a)	Ca	Indidato	(a)
e ap	rova	da pe	la Co	missão	Julg	jadora.	
	gur sizhivarañ M	Sr	rkec	coli	n	ntel	_

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Biologia Celular e Estrutural na área de Biologia Celular.

i

Orientadora: Profa. Dra. Shirlei Maria Recco Pimentel Co-Orientadora: Profa. Dra. Anete Pereira De Souza

Campinas, 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Conte, Mônica Desenvolvimento de microssatélites e análise populacional de espécies de *Physalaemus* do grupo "cuvieri" (Anura, Leiuperidae) / Mônica Conte. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.
Orientadoras: Shirlei Maria Recco-Pimentel, Anete Pereira de Souza. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
1. Anuro - População. 2. Microssatélites (Genética).
3. *Physalaemus*. 4. Genética de populações. I. Recco-Pimentel, Shirlei Maria, 1954-. II. Souza, Anete Pereira de. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Título em inglês: Microsatellites development and populational analysis of *Physalaemus* species of the "cuvieri" group (Anura Leiuperidae).

Palavras-chave em inglês: Anura - Population; Microsatellites (Genetics); *Physalaemus;* Population genetics.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Shirlei Maria Recco-Pimentel, Marcelo Mattos Cavallari, Eliana Morielle Versute, Mariana Pires de Campos Telles, Luciana Bolsoni Lourenço.

Data da defesa: 31/07/2009.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 31 de julho de 2009.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Shirlei Maria Recco Pimentel (Orientadora)

Assinatura

Assinatura

Mara's M. Can I'm

Assinatura

Assinatura

Assinatura

Assinatura

Profa. Dra. Eliana Morielle Versute

Profa. Dra. Mariana Pires de Campos Telles

Profa. Dra. Luciana Bolsoni Lourenço Morandini

Prof. Dr. Marcelo Mattos Cavallari

Profa. Dra. Ana Cristina Prado Veiga Menoncello

Profa. Dra. Ana Paula Zampieri Silva de Pietri

Prof. Dr. Odair Aguiar Junior

Ao meu pai Antonio pelo exemplo de coragem e fé ao longo de turbulados eventos e à minha mãe Eleni, que mostrou que com dedicação, esperança e amor superamos qualquer desafio. Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à **Deus** pela minha vida, força, saúde, iluminação, e principalmente por ter colocado em meu caminho pessoas tão especiais como estas que cito abaixo.

Para a realização deste trabalho tive a orientação da **Profa. Dra. Shirlei Recco-Pimentel**, e fica aqui meu imenso agradecimento por ter me aceitado em seu laboratório, pela sua contribuição na minha formação como pesquisadora, pelos seus conselhos, por me ouvir e entender os momentos difíceis que passei ao longo desses últimos anos. Muito obrigada!

Agradeço à minha co-orientadora, **Profa. Dra. Anete Pereira de Souza**, por ter aberto seu laboratório, por ter acreditado em minha capacidade e por ter participado do meu amadurecimento pessoal e profissional. Muito obrigada pelos conselhos, sempre que estava meio cansada, desanimada com algum resultado, era só dar uma passadinha na sua sala, que já me reestruturava, e buscava novas forças e vontade para continuar. Obrigada!!

Agradeço muito à minha colaboradora **Profa. Dra. Maria Imaculada Zucchi**, pela paciência de lidar com minhas ansiedades, por tantos emails que mandei, por me ensinar a rodar os tantos programas, e depois, me ajudar com os resultados, enfim, obrigada por todo o suporte profissional, sem você não chegaria tão longe, e obrigada pela sua amizade, confiança, incentivo, torcida... Foi ótimo poder contar com uma pessoa maravilhosa como você nesses anos. Obrigada! Agradeço às pessoas que colaboraram com as coletas para a realização deste trabalho: **Profa. Dra. Gilda Andrade, Profa. Dra. Denise Rossa-Feres** e **Profa. Dra. Christine Strüssmann,** e aos professores que compuseram a Banca Examinadora.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutral**, a todos os professores e funcionários do Departamento meu muito obrigado! Agradeço muito toda eficiência e paciência da **Líliam Panagio.**

À CAPES/PROEX (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro. E ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Renováveis (IBAMA), pela autorização de coletas dos exemplares, (Processos n.: 02001.002001/2005-27 e 02010.002895/2003).

Ao pessoal do laboratório da Bio Celular, **Thiago, Eduardo, Yeda, Gisele**, obrigada por dividir o espaço, tristezas, alegrias comigo, e ao **Prof. Dr. Sérgio Siqueira Jr.**, (parabéns!) pela amizade (7 anos!!!), pela companhia nos almoços no bandejão, pelos conselhos nos problemas do dia-a-dia, e pelas coletas de muito dos meus sapinhos, sem os quais não realizaria este trabalho. Sou muito grata por ter a sua amizade!

Aos professores **Dr. Odair Aguiar** e **Dra. Ana Cristina Veiga-Menoncello**, vocês foram as primeiras pessoas a me ensinar extração de DNA (já fiquei fascinada!), e Ana, obrigada pelas palavras de conforto nos meu momentos difíceis. E à profa. **Dra. Luciana Bolsoni Lourenço**, pela ajuda nos meus primeiros PCRs e géis.

Ao pessoal do lab – CBMEG, Letícia J. Cançado e Melissa de Oliveira, pela ajuda na construção do banco de microssatélites, e depois pela ajuda no meu início no laboratório.. ai até saber onde ficavam as coisas... Obrigada Tatiana, Adna, Fernanda, Gustavo, Danilo, Estela, Tallis, Aline, Lívia, Bianca pelo apoio, pelas risadas, vocês são ótimos! Obrigada à Vânia, e à Patrícia pela ajuda no preparo dos géis, e pela amizade! Ainda gostaria de agradecer ao Thiago pela grande ajuda em vários momentos, seja no PCR que não funciona, seja na diluição de primers, e por se tornar um grande amigo; ao Ju por toda paciência comigo e pelas risadas depois das nossas aulas de inglês; à Melissa, sempre pronta a me ajudar no dia-a-dia do laboratório, obrigada Melissa, pelas conversas sobre coisas da vida, pelos conselhos e por ouvir meus desabafos; e finalmente à Prianda, uma pessoa maravilhosa, que com toda paciência do mundo, me ajudou nos desenhos dos primers, e tantas outras coisas, mas o mais importante é que você foi o ombro amigo quando mais precisei. Obrigada!!

Talvez caiba aqui um agradecimento à **Roberta**, que já fez parte do lab, por toda ajuda nas horas difíceis, pelas palavras de conforto, pela amizade! Você está fazendo muita falta aqui!!

Aos meus outros grandes amigos que cruzaram meu caminho, Prof. Dr. André Mampumbu, e Marcos Siqueira, meu obrigado!

A todos vocês um obrigado sincero. É muito bom saber que estou ao lado de pessoas boas e especiais como vocês, e fiquem sabendo que vocês, cada um de seu jeito, contribuíram para este trabalho. Muito obrigada meus amigos!

"Mesmo que as pessoas mudem e suas vidas se reorganizem, os amigos devem ser amigos para sempre, mesmo que não tenham nada em comum, somente compartilhar as mesmas recordações." Vinícius de Moraes. Agradeço à minha família, meus irmãos **Márcio** e **Renato**, às minhas irmãs de coração **Ana Paula**, **Regiane** pelo apoio nesses anos todos e pela compreenssão de algumas ausências em alguns encontros de família. Obrigada meus sobrinhos lindos **Aline**, **Rafa**, e **Raquel** pelos sorrisos que vocês colocam em meu rosto quando me lembro de vocês.

Agradeço pelos meus pais **Antonio** e **Eleni** por sempre estarem ao meu lado, por participarem dos meus sonhos. Tenham certeza que cheguei onde cheguei porque vocês são a minha base, a minha estrutura. Obrigada pelo exemplo de determinação que vocês me deram. Amo vocês! Pai, você que sempre foi meu amigo, meu herói, me ensinou ter paciência, humildade, perseverança, nem imagina a falta que você está fazendo na minha vida!

E finalmente, agradeço ao **Marco**, companheiro e amigo, pelo amor, compreensão às minhas mudanças de humor (!!!), por fazer parte da minha vida, por me ajudar com os "paus" do computador, por ficar instalando e desinstalando programas, e ainda, fazendo-os funcionar, obrigada por me ajudar com meus géis de acrilamida, por ir buscar sapinhos comigo, por entender que precisava ficar até mais tarde trabalhando. Obrigada ainda pelos abraços apertados e palavras de incentivo quando eu não estava bem, ou quando tudo parecia estar fora do meu controle. Obrigada pela sua força e vibração com cada gel que dava certo, ou cada artigo terminado. Lindo, obrigada por estar sempre comigo, lutar comigo, e me ajudar a carregar alguns fardos (por ora bem pesados) que às vezes a vida nos dá. Amo você!

1. RESUMO					
2. ABSTRACT	12				
3. INTRODUÇÃO	14				
3.1. Microssatélites como marcadores moleculares	14				
3.2. Microssatélites em anuros	18				
3.3. As espécies do grupo de Physalaemus cuvieri	20				
3.4. Physalaemus cuvieri e estrutura genética de populações	21				
3.5. Objetivos	25				
3.5.1. Gerais	25				
3.5.2. Específicos	26				
3.6. Referências bibliográficas	26				
4. ARTIGOS	36				
4.1 Isolation and characterization of polymorphic microsatellites for the natural populations of barker frog <i>Physalaemus cuvieri</i>	37				
populations of barker nog r hysataemas current					
4.2 Population genetic structure of the Neotropical frog <i>Physalaemus cuvieri</i>					
(Anura, Leiuperidae) in diverse regions of Brazil	41				
4.3 Study of cryptic species within the <i>Physalaemus cuvieri</i> group (Anura): contribution from microsatellites markers	69				
5. CONCLUSÕES	94				
6. APÊNDICE	98				

ÍNDICE

1. RESUMO

Muitas espécies de anfíbios estão entre as mais ameaçados de extinção, e no entanto, informações sobre a variabilidade genética e a estruturação genética das suas populações são ainda limitadas. No presente trabalho, a variabilidade genética de populações da espécie Physalaemus cuvieri foi analisada utilizando microssatélites como marcadores moleculares. Considerando-se sua ampla distribuição geográfica, variação morfológica interpopulacional e variação intra- e interpopulacional em algumas características citogenéticas, espécimes de dez populações de P. cuvieri foram amostradas, em São Pedro da Água Branca (MA), Urbano Santo (MA), Porto Nacional (TO), Uberlândia (MG), Vitória Brasil (SP), Palestina (SP), Nova Itapirema (SP), Chapada dos Guimarães (MT), Vitória da Conquista (BA) e Passo Fundo (RS). Dez locos de microssatélites de P. cuvieri foram isolados a partir de uma biblioteca enriquecida em repetições (CA)8 e (GT)8. A amplificação desses locos em 160 indivíduos de P. cuvieri revelou uma média de 5,7 alelos por loco e uma heterozigosidade esperada variando de 0,30 a 0,85. Embora a maior parte da variação genética esteja dentro das populações, o valor global do F_{ST} encontrado indica uma alta diferenciação entre essas populações. O baixo fluxo gênico encontrado sugere baixa capacidade dispersiva, no padrão de escala geográfica usado neste trabalho, e condiz com o comportamento filopátrico atribuído aos anuros. Nesse estudo foi ainda verificado que não existe correlação entre distância geográfica e distância genética das populações amostradas, sugerindo uma alta fidelidade dessa espécie aos seus locais de desova. Os resultados indicam que a distância geográfica sozinha não explica a variabilidade genética dessas populações. Duas populações, São Pedro da Água Branca (MA) e Nova Itapirema (SP), possivelmente passaram por efeito de gargalo

populacional (*bottleneck*), que pode ser resultado, entre outros fatores, da destruição de habitat levando à fragmentação da população.

Dos dez locos de microssatélites desenvolvidos para P. cuvieri, nove foram utilizados para verificar a possibilidade de amplificação e sua aplicabilidade no estudo da estrutura genética de duas outras espécies do grupo cuvieri muito proximamente relacionadas à P. cuvieri. Essas espécies são: P. ephippifer (15 indivíduos) e P. albonotatus (11). As duas populações estudadas ficaram isoladas das cinco de P. cuvieri, mostrando um alto grau de diferenciação genética, e indicando claramente sua condição de espécie distinta de P. cuvieri. A população de Crateús - CE agrupou com Urbano Santos - MA (ambas P. cuvieri). Este resultado corrobora os resultados de estudos citogenéticos. As populações de Porto Nacional (TO) e Passo Fundo (RS) formaram dois grupos de indivíduos cada uma. Parte dos indivíduos de Porto Nacional agrupou com a população de Uberlândia (MG) de P. cuvieri, e o restante dos indivíduos não mostrou nenhum agrupamento com qualquer outra população e espécies analisadas neste trabalho. Resultados semelhantes foram obtidos com a população de Passo Fundo, que não mostrou agrupamento com nenhuma outra população analisada. Estudos adicionais dessas populações serão necessários para melhor compreender esses dados. O conhecimento do padrão de dispersão da variabilidade genética de P. cuvieri, avaliada por microssatélites, somado ao conhecimento acumulado, obtido por meio de outras metodologias, poderá contribuir para a definição de estratégias de conservação e contribuir para o delineamento entre as fronteiras taxonômicas dessa espécie.

2. ABSTRACT

Even though many amphibian species are among the most endangered animals, the knowledge about their genetic variability and population genetic structure is still limited. In the present work, natural populations of the barker frog *Physalaemus cuvieri* were analyzed for genetic variability and differentiation using microsatellites, considering its wide geographic distribution, interpopulational morphological variation and cytogenetic intra- and interpopulational variation. Analyzes comprised specimens from ten P. cuvieri populations sampled in the following regions of Brazil: São Pedro da Água Branca (MA), Urbano Santo (MA), Porto Nacional (TO), Uberlândia (MG), Vitória Brasil (SP), Palestina (SP), Nova Itapirema (SP), Chapada dos Guimarães (MT), Vitória da Conquista (BA) and Passo Fundo (RS). Ten microsatellite loci were isolated for P. cuvieri from a library enriched in (CA)₈ and (GT)₈ repeats. In 160 P. cuvieri individuals, the average number of alleles per locus was 5.7 and the expected heterozygosity ranged from 0.30 to 0.85. Although most of the genetic variation was found within populations, the overall F_{ST} value indicated high genetic differentiation among the populations. The low gene flow among populations suggested low dispersion capability within the geographic scale pattern used in this work, which is compatible with the anuran philopatric behavior. In addition, there was no correlation between geographic and genetic distances of these populations, suggesting fidelity of P. cuvieri populations to their spawning place. These results indicated that the geographic distance alone does not explain the genetic variability observed among these populations. The data also indicated that the populations from São Pedro da Água Branca (MA) and Nova Itapirema (SP), respectively in the Northeast and Southeast regions of Brazil, have likely gone through a recent population bottleneck effect. Destruction of natural

habitats leading to population fragmentation could be a major cause of this suggested bottleneck effect.

Of the ten microsatellite loci developed for *P. cuvieri*, nine were used to investigate cross-amplification and suitability for population genetic structure studies in two other species of the *cuvieri* group closely related to *P. cuvieri*. These species are: *P. ephippifer* (15 specimens) and *P. albonotatus* (11 specimens). These two populations remained isolated from all populations of *P. cuvieri*, demonstrating its high genetic differentiation, pointing that these two species are distinct from *P. cuvieri*. The Crateús (CE) population was grouped with Urbano Santos (MA) population (both *P. cuvieri*). This result corroborated previous cytogenetic results. The Porto Nacional (TO) and Passo Fundo (RS) populations were divided in two sets of individuals each one. Part of Porto Nacional individuals were clustering with *P. cuvieri* from Uberlândia (MG), and the remaining did not show any grouping with none of other analyzed species. Similar results were found to Passo Fundo population, which also did not show any group with the analyzed species.

The knowledge of the dispersion pattern of the *P. cuvieri* genetic variability evaluated by microsatellites, in addition to the genetic variability data obtained using other methodologies, will contribute for the development of future ecological and conservation strategies and to improve the taxonomy of this species

3. INTRODUÇÃO

3.1. Microssatélites como marcadores moleculares

Microssatélites são seqüências simples repetidas (SSRs) *in tandem*, com tamanho variando de 2 a 10 pares de bases (Bull et al. 1999), e de acordo com outros autores, variando de 2 a 6 pares de bases (*i.e.* Li et al. 2002). De acordo com o trabalho de Tóth et al. (2000), que estudaram a distribuição das sequências repetitivas em introns, éxons e regiões intragênicas de muitos grupos taxonômicos de eucariotos, os dinucleotídeos com motivos de repetições $AC_{(n)}$ são mais frequentes em vertebrados e artrópodes. Os trinucleotídeos podem ser encontrados com uma frequência significante e variavél nas regiões genômicas e entre os táxons, sendo que em primatas e roedores, CCG constitui o segundo maior tipo de repetição em éxons. Nos vertebrados, as demais repetições, como tetranucleotídeos, são mais abundantes nos íntrons e regiões intragênicas, sendo que em mamíferos, os pentanucleotídeos são menos frequentes nessas mesmas regiões. Hexanucleotídeos são mais frequentes depois dos trinucleotídeos em regiões de éxons.

A importância funcional dos microssatélites está possivelmente ligada aos seus efeitos sobre a organização da cromatina, regulação da atividade gênica, recombinação, replicação de DNA, ciclo celular, sistema de reparo, entre outros (Li et al. 2002).

A abundância de microssatélites genômicos e suas várias funções e consequências estão associadas a sua taxa de mutação altamente elevada $(10^{-2} a 10^{-6} eventos por loco por geração)$ (Nielsen & Palsboll 1999). Os mecanismos envolvidos não são muito conhecidos, mas estudos experimentais mostram que essas mutações nos locos podem resultar em insersões ou deleções das repetições (Kimmel et al. 1996). O modelo mais aceito é o *slippage* da DNA polimerase durante a replicação do DNA

(Levinson & Gutman 1987; Schlötterer & Tautz 1992; Li et al. 2002; Zane et al. 2002). Devido à homologia dentro das repetições dos microssatélites, as duas fitas de DNA podem se alinhar incorretamente depois da dissociação, introduzindo um "loop" numa das fitas resultando na expansão/contração dos microssatélites. Entretanto, há algumas evidências mostrando que a formação dessas estruturas secundárias do DNA pode ocorrer também durante a recombinação e reparo (Oliveira et al. 2006).

A taxa de mutação nos microssatélites depende em parte de características intrínsecas, como número de unidades repetitivas e comprimento (em pares de base). Microssatélites com maior número de repetições são mais mutáveis devido ao aumento da probabilidade de *slippage* e microssatélites com maior comprimento, sem restrição no número de repetições, são mais instáveis facilitando o *slippage* e assim elevando as taxas de mutação (Katti et al. 2001; Kelkar et al. 2008).

A teoria do *slippage* não pode explicar sozinha a distribuição dos microssatélites no genoma como um todo, uma vez que o potencial inerente de uma sequência formar conformações alternativas no DNA pode ser importante para gerar os SSR mas não para as diferenças observadas ao longo dos táxons. Enzimas e outras proteínas envolvidas em replicação e reparo do DNA e remodelamento da cromatina podem ser responsáveis pela táxon-especificidade dos SSR (Tóth et al. 2000). Outras mudanças no número de repetições dos microssatélites podem ser causadas pelo *crossing-over* desigual ou conversão gênica durante recombinação entre os filamentos de DNA (Hancock 1999; Li et al. 2002). Adicionalmente, tem-se associado os SSRs com uma Família *Alu*, resultado de uma interação de um elemento *Alu* dentro de uma repetição de microssatélite preexistente. Erros introduzidos durante a transcrição dos derivados de um gene *Alu* ou ao acúmulo de mutações ao acaso em regiões dos elementos *Alu*, podem resultar nas repetições dos microssatélites (Arcot et al. 1995).

Para o uso de dados de microssatélites na explicação de parâmetros populacionais como diferenciação genética e número de migrantes por geração faz-se necessário assumir um modelo de mutação para esse marcador. O modelo mutacional, denominado Infinite Allele Model (IAM) (Kimura & Crow 1964), considera que a mutação envolve qualquer número de repetições in tandem e sempre resulta num estado do alelo não previamente encontrado na população (Estoup & Cornuet 1999). O IAM não permite homoplasia e assume que cada mutação resulta na criação de um novo alelo (Dettman & Taylor 2004). Outro modelo, Stepwise Mutation Model (SMM), (Kimura & Ohta 1978) descreve a mutação nos alelos dos microssatélites por perda ou ganho de uma única repetição. Di Rienzo e colaboradores (1994) propuseram um novo modelo mutacional, o Two Phase Model (TPM) que assume primeiramente mudanças em repetições simples (single-step) no tamanho do alelo e também incluem raros, mas importantes eventos de maiores magnitudes (como os crossing-over desiguais). No TPM, existe a probabilidade p de ser uma mutação de uma única unidade e 1-p de envolver mais de uma unidade de repetição. Raramente citado na literatura, o modelo chamado de K-alleles (KAM – K-Alleles Model), também pode ser considerado para os microssatélites. Nesse modelo Crow & Kimura (1970) propuseram que existem K possíveis alelos em determinado loco, e qualquer alelo tem uma probabilidade constante $[\mu/k - 1]$ de mutação, onde μ é a taxa de mutação.

De modo geral não existe um modelo de mutação único e amplamente aceito, já que nenhum desses reflete a realidade dos microssatélites, porém, esses marcadores são

amplamente usados e úteis para acessar a diversidade genética de diversas populações (Balloux & Moulin 2002).

Microssatélites como marcadores moleculares têm sido utilizados principalmente para investigar a estruturação genética de populações naturais, em genética forense, no estudo de mutações de doenças na pesquisa de tumores e cânceres, no mapeamento genético, entre outros (Lai & Sun 2003; Jones & Ardren 2003). Esse amplo emprego dos microssatélites deve-se também ao fato deles permitirem interpretação por uma simples reação de PCR, serem encontrados nos genomas de todos os organismos eucariontes analisados até o momento e apresentarem altos níveis de polimorfismo (Levinson & Gutman 1987; Schlötterer & Tautz 1992; Csink & Henikoff 1998; Katti et al. 2001; Li et al. 2002; Zane et al. 2002; Vicente et al. 2003; Kelkar et al. 2008). São co-dominantes e multi-alélicos (Torres 2006) e ainda são altamente polimórficos e ideais para estudos de mapeamento e diversidade genética (Jarne & Lagoda 1996).

Mais recentemente, esse marcador tem sido preferido para esse tipo de estudo em detrimento ao tão propagado estudo de DNAmt que oferece várias vantagens mas que pode mostrar padrões de diferenciação entre as populações que não refletem a história de diferenciação do genoma nuclear, onde supostamente ocorrem os locos que controlam os traços de significado adaptativo (Monsen & Blouin 2003). Esses pesquisadores mostraram a diferenças entre resultados obtidos a partir de DNAmt e nuclear em um estudo com *Rana cascadae*, em que os dados interpretados isoladamente poderiam levar a recomendações de conservação muito diferentes.

Levando-se em conta que as espécies muitas vezes são distribuídas geograficamente de modo desigual ou irregular, elas podem ser divididas dentro de

numerosas populações que variam na razão da troca de indivíduos com outras populações. O padrão de dispersão tem um papel na determinação geográfica da espécie. Investigações de dispersão e suas conseqüências, juntamente com outros processos relacionados à ecologia e evolução têm sido facilitadas pelo uso de marcadores genéticos. Mesmo em pequenas escalas espaciais e temporais dos padrões atuais de movimento e de fluxo gênico, esses marcadores moleculares têm permitido um grande entendimento das interações entre as populações (Newman & Squire 2001).

O conhecimento de como a variação gênica está distribuída entre as populações pode ter importante implicação tanto na biologia evolutiva e na ecologia, como também na conservação biológica, já que as diferenças entre populações representam importante ferramenta para se desenvolver estratégias de conservação (Balloux & Moulin 2002). Os locos microssatélites permitem o entendimento da estrutura da população em questão (Slatkin 1995) e, ainda, são sensíveis o suficiente para detectar eventos recentes de fragmentação antropogênica (Storfer 2003).

Assim, os microssatélites são cada vez mais aceitos como marcadores em análises populacionais para genética de conservação animal e vegetal, e seu uso para investigação de estrutura populacional de anfíbios é mais recente (Burns et al. 2004; Arens et al. 2006; Allentoft et al. 2008).

3.2. Microssatélites em anuros

O declínio das populações de anfíbios em todo o mundo pode ser considerado dramático de acordo com pesquisa recente, pois 32% das espécies foram colocadas na lista de animais ameaçados de extinção (Stuart et al. 2004; IUCN 2009). Os anfíbios são especialmente vulneráveis às modificações e perdas de seus habitats, à introdução de espécies não nativas e devido, em parte, à sua pele permeável (Alford & Richards

1999), eles ainda sofrem com mudanças climáticas, raios ultravioletas e poluição (Storfer 2003; Stuart et al. 2004). Assim, eles podem servir como espécies sentinelas para esses distúrbios em habitats especializados (Ficetola & De Bernardi 2004; Gonzalez et al. 2004; Telles 2006), e esses casos de declínios de anfíbios podem servir como modelo de entendimento das crises da biodiversidade global em geral (Storfer 2003).

Estudos recentes relacionam o aquecimento global com a proliferação do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*, que parasita a pele de algumas espécies de anuros podendo levá-los a extinção (Morehouse et al. 2003; Pounds et al. 2006; Toledo et al. 2006). Outro fator que ameaça populações de anfíbios é a desconexão de habitats (*habitat split*). De acordo com Becker et al. (2007), essa desconexão, de ação antrópica, entre habitats que são usados por diferentes estágios de vida de uma espécie, pode contribuir para o declínio de anfíbios, pois afeta diretamente a área de distribuição geográfica das espécies, reduzindo seus tamanhos populacionais, e ainda dificulta o fluxo gênico entre populações contribuindo para a perda de diversidade a longo prazo.

Há, no entanto, poucos estudos em populações de anfíbios utilizando marcadores microssatélites e a maioria dos estudos trata apenas da caracterização de *primers* e da obtenção de bibliotecas genômicas enriquecidas de microssatélites, principalmente em espécies de *Rana* (Berlin et al. 2000; Zeisset et al. 2000; Pröhl et al. 2002) e de *Bufo* (Brede et al. 2001). Mesmo com o aumento no desenvolvimento de *primers* de microssatélites para espécies de anfíbios, sua aplicação na genética de populações e nos estudos de conservação de anuros ainda permanece com muitas lacunas (Pröhl et al. 2002).

3.3. As espécies do grupo de Physalaemus cuvieri

O gênero *Physalaemus*, juntamente com *Edalorhina*, *Eupemphix*, *Pleurodema*, *Pseudopaludicola* e *Somuncuria*, foi recentemente alocado na família Leiuperidae (Grant et al. 2006). Atualmente, o gênero é composto por 45 espécies (Frost 2009), e tem ampla distribuição geográfica na América do Sul, englobando as regiões brasileiras, Misiones e Entre Ríos, Argentina, leste do Paraguai, Santa Cruz na Bolívia e provavelmente nas planícies do sul da Venezuela.

As espécies desse gênero foram distribuídas por Nascimento et al. (2005) em sete grupos fenéticos: "cuvieri", "signifer", "albifrons", "deimaticus", "gracilis", "henseli" e "olfersii", mas as relações filogenéticas intragenéricas ainda permanecem pouco conhecidas. Esse gênero apresenta grande quantidade de polimorfismos e algumas espécies crípticas (Barrio 1965; Frost 2009), o que dificulta o reconhecimento de uma dada população baseado apenas em critérios morfológicos. Confusões ocorrem, por exemplo, com *P. biligonigerus* e *P. fuscomaculatus*, e com *P. cuvieri, P. ephippifer, P. centralis e P. albonotatus* (Barrio 1965), entre outras.

O grupo *cuvieri* mostra uma vasta diversidade de formas e história de vida, e é atualmente constituído por nove espécies, *P. albonotatus*, *P. centralis*, *P. cicada*, *P. cuqui*, *P. cuvieri*, *P. ephippifer*, *P. erikae*, *P. fischeri* e *P. kroyeri*, de acordo com a recente revisão taxonômica realizada por Nascimento et al. (2005). As espécies do grupo "cuvieri" apresentam ampla distribuição geográfica, fazendo com que esse grupo esteja representado do Norte ao Sul da América do Sul, a leste dos Andes, ocorrendo da Venezuela à Argentina, em formações abertas do Cerrado, Caatinga, Chacos e em regiões de domínios planos (Nascimento et al. 2005).

As espécies do grupo *cuvieri* caracterizam-se por apresentarem tamanhos variando de 14 a 39mm de comprimento (rostro-anal; *snout-vent lenght*), pele lisa com algumas verrugas, o primeiro dedo não é maior que o segundo, e os machos têm uma vocalização característica, semelhante a um latido de cachorro, resultando no seu nome popular, (rã-cachorro) (Cruz & Pimenta 2004). Os machos vocalizam às margens de corpos de água temporários ou permanentes (Barreto & Andrade 1995). O amplexo é axilar e a desova consite em um ninho de espuma feito pelos machos durante o amplexo (Wogel et al. 2002), como ocorre em outros grupos do gênero (Hödl 1990).

A espécie *Physalaemus cuvieri* é amplamente distribuída pela América do Sul, em todo território brasileiro, e ainda em Misiones e Corrientes na Argentina, oeste do Paraguai, Santa Cruz na Bolívia e provavelmente no sul da Venezuela (Cei 1980; Frost 2009). No Brasil, foram descritas variações morfológicas intra-específicas. Barreto e Andrade (1995) verificaram que populações do nordeste e do sudeste reproduzem em épocas distintas, embora a biologia reprodutiva seja a mesma.

3.4. Physalaemus cuvieri e estrutura genética de populações

Uma população pode ser definida como um grupo de indivíduos da mesma espécie que se intercruzam (grupo panmítico) e que exibem um padrão não aleatório de estrutura geográfica (Hartl & Clark 1997; Conner & Hartl 2004). Processos evolutivos como variação genética, frequências alélicas e genotípicas, fluxo gênico, seleção natural, migração, deriva genética, atuam primeiramente no contexto de cada espécie, dentro de suas populações (Conner & Hartl 2004).

A estrutura genética de populações é mais comumente estudada a partir das estatísticas F (Wright 1951), as quais proporcionam uma visão integral da variação genética em três níveis da estrutura de populações: dentro (F_{IS}) e entre (F_{ST})

subpopulações, e o total (F_{TT}) de variação na metapopulação (Conner & Hartl 2004). O uso do F_{ST} para calcular o fluxo gênico é bastante controverso e não corresponde às populações naturais (Whitlock & McCauley 1999; Neigel 2002). A estimativa de fluxo gênico baseado no F_{ST} assume modelo de ilha e estipula um número infinito de populações com troca de migrantes numa taxa constante, o que não se aplica aos dados de populações reais. Porém, mesmo com essas limitações, F_{ST} é uma medida indireta de fluxo, sendo expressa pelo número de migrantes Nm=1/4 (1/Fst - 1) (Wright 1951), permanece como uma medida útil de fluxo gênico e ainda é amplamente usado para diferenciação entre populações. Uma estatística usada como medida de diferenciação de populações, análoga ao F_{ST} , é a estatística proposta por Nei (1973), G_{ST} , e baseia-se na quantidade de variação entre populações relativa a variação total e não especifica a identidade dos alelos envolvidos (Hedrick 2005).

Populações de *P. cuvieri* já foram estudadas por Telles et al. (2006), os quais usaram marcadores do tipo RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) para analisar a estrutura genética de 18 populações do Cerrado. Os autores encontraram uma estruturação da variabilidade genética entre essas populações, apresentando valores em torno de 0,10 para o componente interpopulacional da variabilidade genética, e um restrito fluxo gênico. Esses autores ainda analizaram a correlação entre distância genética e geográfica a partir do correlograma espacial de Mantel e evidenciaram uma correlação significativa entre as duas variáveis apenas entre pequenas distâncias, o que é esperado se os baixos níveis de diferenciação populacional são combinados com maior fluxo gênico. Assim, os resultados que eles encontraram para a relação entre distância genética e geográfica e padrões de diferenciação populacional estariam dentro do princípio de modelo de ilhas de Wright.

O gênero Physalaemus e populações de P. cuvieri também foram estudados citogeneticamente por Beçak et al. (1970), Amaral et al. (1999), Lourenço et al. (1999), Silva et al. 1999, Quinderé et al. (2009) e Quinderé et al. (in prep.). Até o momento, esses estudos mostraram que o gênero Physalaemus apresenta um número diplóide conservado de 22 cromossomos que diferem muito pouco em sua morfologia entre as espécies. Physalaemus cuvieri foi inicialmente descrito com técnicas convencionais por Beçak et al. (1970). Uma caracterização citogenética detalhada foi realizada posteriormente (Silva et al. 1999; Quinderé et al. 2009). em populações de P. cuvieri do norte, nordeste, sul e sudeste do Brasil (Silva et al. 1999; Quinderé et al. 2009) que mostraram uma grande e interessante variabilidade no padrão de NOR (Região Organizadora do Nucléolo) entre as populações, permitindo distinguir dois grupos, um do nordeste/norte e outro do sul do Brasil e Argentina. O primeiro grupo engloba as populações de Urbano Santos (MA), Crateús (CE), São Pedro da Água Branca (MA), Palmeiras (BA) e Uberlândia (MG), todas com NOR no par 8 (algumas delas apresentaram ainda variações interpopulacionais com NORs adicionais no par 7 ou nos pares 7 e 9). O segundo grupo compreende as populações da Argentina (Quinderé et al. 2009) e de Boracéia (SP) e Santa Maria (RS) (Silva et al. 1999) que apresentaram NOR no par 11. Porém, a população de Porto Nacional (TO), estudada por Quinderé et al. (2009), diferiu das demais populações de P. cuvieri analisadas até o momento, por apresentar quatro pares de cromossomos portadores de NOR (1, 3, 4 e 10) e várias bandas C pericentroméricas. Por outro lado, a espécie críptica P. ephippifer também apresentou a NOR no par 8, porém com os homólogos homomórficos nos machos e heteromórficos nas fêmeas, sugerindo um sistema de determinação do sexo do tipo ZZ/ZW.

Em estudos relacionando valores de F_{ST} e distância geográfica, Lampert et al. (2003) usaram microssatélites para analisar 17 populações de *Physalaemus pustulosus* e encontraram F_{ST} variando de 0,0 a 0,039, indicando um alto nível de diferenciação genética dentro das populações e pouca diversidade entre elas, numa pequena escala geográfica, variando de 0,26 a 11,8 km, apresentando correlação entre distância genética e geográfica.

Os demais trabalhos disponíveis na literatura sobre estrutura genética de anfíbios anuros referem-se a outras espécies e gêneros. Driscoll (1998a), usando alozimas para estudo de *Geocrinia alba* e *G. vitellina* (Myobatrachidae), encontrou altos valores de F_{ST} de 0,444 e de 0,302, respectivamente, indicando grande diferenciação entre as populações destas espécies. Em outro estudo, Driscoll (1998b) encontrou F_{ST} de 0,69 e 0,64 para *Geocrinia rosea* e *G. lutea*, respectivamente, indicando forte estruturação entre as populações e confirmando a baixa dispersão dessas espécies. Usando DNA mitocondrial e SSCP, Shaffer et al. (2000) estudaram a espécie *Bufo canorus* (Bufonidae), e encontraram F_{ST} 0,76 para todos os locais de desova, mostrando uma alta variabilidade entre as populações estudadas. Rowe et al. (2000) usaram microssatélites para estudo de *Bufo calamita* e encontraram um valor de F_{ST} 0,060 para uma região com distância geográfica pequena entre os locais de coleta, e valores mais altos de F_{ST} (0,224 e 0,111) nos locais que tinham maior distância geográfica. Existe variação nos valores de F_{ST} independe, portanto, das escalas de análise, e outros fatores devem ser levados em consideração, tais como ecológicos, evolutivos e comportamentais (Telles 2005).

Barber (1999) usando DNA mitocondrial, encontrou um alto nível de fluxo gênico, (estimado a partir dos valores de Φ_{ST}), entre subpopulações de *Hyla arenicolor* (Hylidae) dentro de uma região, não exibindo um padrão de isolamento por distância, porém, entre outras três regiões estudadas nenhum fluxo foi observado, provavelmente devido à barreira geográfica.

Alguns estudos sobre estrutura genética de populações com o uso de marcadores moleculares suportam a hipótese de que uma dada população de anfíbios tende a estar relativamente isolada das demais populações (Shaffer et al. 2000). Os anfíbios muitas vezes exibem forte fidelidade ao seu habitat e possuem baixa habilidade dispersiva, e esse comportamento pode limitar a troca gênica entre populações (Newman & Squire 2001; Burns et al. 2004; Funk et al. 2005). Seppä e Laurila (1999) mostraram que entre os vertebrados, os anfíbios são os animais que exibem baixa dispersão sendo altamente filopátricos, o que os torna mais vulneráveis às degradações do meio ambiente e às drásticas mudanças no tamanho da população (Ficetola & De Bernardi 2004), levando à perda da variabilidade genética em populações pequenas e isoladas (Johansson et al. 2007). O baixo fluxo gênico somado com a pequena capacidade dispersiva e ainda adicionando dados sobre o declínio de muitas espécies de anuros, contribui de maneira negativa para a persistência das popualções. Assim, o conhecimento da dinâmica espacial-temporal relacionado com padrões de diversidade genética entre populações é crítico para esforços de conservação para manutenção de espécies viáveis (Avise 2004; Telles et al. 2006; Morgan et al. 2008).

3.5. Objetivos

3.5.1. Gerais

Esse trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar marcadores microssatélites em *Physalaemus cuvieri*, visando a análise da estrutura genética e ampliando o conhecimento sobre a variabilidade genética de espécies do grupo de *P. cuvieri*.

3.5.2. Específicos

i) Desenvolvimento de marcadores específicos do tipo microssatélites para *P. cuvieri*;
ii) Estudos da variabilidade genética intra- e interpopulacional de 10 populações de *P. cuvieri* provenientes de diversas regiões do Brasil;

iii) Testar a possibilidade de amplificação dos marcadores desenvolvidos para *P. cuvieri* bem como sua aplicabilidade para estudo de espécies proximamente relacionadas e morfologicamente muito semelhantes a *P. cuvieri*, como *P. ephippifer* e *P. albonotatus*.

3.6. Referências bibliográficas

- Allentoft ME, Siegismund HR, Briggs L, Andersen LW (2008) Microsatellite analysis of the natterjack toad (*Bufo calamita*) in Denmark: populations are island in a fragmented landscape. Conserv Genet 10: 15-28
- Alford RA, Richards SJ (1999) Global amphibian declines: a problem in applied ecology. Annual Review of Ecology and Systematics 30: 133-165.
- Amaral MJLV, Recco-Pimentel SM, Cardoso AJ (1999) A comparison of the sperm nucleoprotein composition in the genus *Physalaemus* (Amphibia, Anura). Cytobios 100: 147-157.
- Arcot SS, Wang Z, Weber JL, Deininger PL, Batzer MA (1995) Alu repeats: a source for the genesis of primate microsatellites. Genomics 29: 136-144.
- Arens P, Bugter R, Westende W, Zollinger R, Stronks J, Vos CC, Smulders MJM (2006) Microsatellite variation and population structure of a recovering tree frog (*Hyla arborea* L.) metapopulation. Conserv Genet 7: 825-834
- Avise JC (2004) Molecular markers, natural history, and evolution. 2ndEdition. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

- Balloux F, Lugon-Moulin N (2002) The estimation of population differentiation with microsatellite markers. Molecular Ecology 11: 155-165.
- Barber PH (1999) Patterns of gene flow and population genetic structure in the canyon treefrog, Hyla arenicolor (Cope). Molecular Ecology 8: 563-576.
- Barreto LN, Andrade GV (1995) Aspects of the reproductive biology of *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leptodactylidae) in northeastern Brazil. Amphibia-Reptilia 16:67-76.
- Barrio A (1965) El gênero *Physalaemus* (Anura, Leptodactylidae) en la Argentina. Physis 25: 421-448.
- Beçak ML, Denaro L, Beçak W (1970) Polyploidy and mechanisms of karyotypic diversification in Amphibia. Cytogenetics 9: 225-238.
- Becker CG, Fonseca CR, Haddad CFB, Batista RF, Prado PI (2007) Habitat split and the global decline of amphibians. Science 318: 1775-1777.
- Berlin S, Merilä J, Ellegren H (2000) Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the common frog, *Rana temporaria*. Molecular Ecology 9: 1938-1939.
- Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, Ng PKL, Meier R, Winker K, Ingram KK, Das I (2007) Cryptic species as a window on diversity and conservation. Trends in Ecology and Evolution 22: 148-155.
- Brede EG, Rowe G, Trojanowski J, Beebee TJC (2001) Polymerase chain reaction primers for microsatellite loci in the common toad *Bufo bufo*. Molecular Ecology Notes 1: 308-310.
- Bull LN, Peña CRP, Freimer NB (1999) Compound microsatellite repeats: practical and theoretical features. Genome Research 9: 830-838.

- Burns EL, Eldridge MDB, Houlden BA (2004) Microsatellite variation and population structure in a declining Australian hylid *Litoria aurea*. Molecular Ecology 13: 1745-1757.
- Cei JM (1980) Amphibians of Argentina. Monitore Zoologico Italiano (n.s.).Monografia 2: 609.
- Conner JK, Hartl DL (2004) A Primer of Ecological Genetics. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 304pp.
- Crow J, Kimura M (1970) An Introduction to Population Genetics Theory. Burgess Publishing Company, Minneapolis, 591 pp.
- Cruz CAG, Pimenta BVS (2004) New species of *Physalaemus* Fitzinger, 1826 from Southern Bahia, Brazil (Anura, Leptodactylidae). Journal of Herpetology 38: 480-486.
- Csink A, Henikoff S (1998) Something from nothing: the evolution and utility of satellite repeats. Trends in Genetics 14: 200-204.
- Dettman JR, Taylor JW (2004) Mutation and evolution of microsatellite loci in *Neurospora*. Genetics 168: 1231–1248.
- Di Rienzo A, Peterson AC, Garza JC, Valdes AM, Slatkin M, Freimer NB (1994)
 Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations.
 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91: 3166-3170.
- Driscoll DA (1998a) Genetic structure, metapopulation processes and evolution influence the conservation strategies for two endangered frog species. Biological Conservation 83: 43-54.

- Driscoll DA (1998b) Genetic structure of the frog *Geocrinia lutea* and *Geocrinia rosea* reflects extreme population divergence and range changes, not dispersal barriers. Evolution 52: 1147-1157.
- Estoup A, Cornuet JM (1999) Microsatellite evolution: inferences from population data.*In*: Microsatellites: Evolution and Applications (eds Goldstein, D.B., Schlötterer, C.)pp. 49-65. Oxford University Press, Oxford.
- Ficetola GF, De Bernardi F (2004) Amphibians in a human-dominated landscape: the community structure is related to habitat features and isolation. Biological Conservation 119: 219-230.
- Fouquet A, Vences M, Salducci MD, Meyer A, Marty C, Blanc M, Gilles A (2007) Revealing cryptic diversity using molecular phylogenetics and phylogeography in frog of *Scinax ruber* and *Rhinella margaritifera* species groups. Molecular Phylogenetics and Evolution 43: 567-582.
- Frost DR (2009) Amphibians species of the world: an online reference. Version 5.3 Electronic database accessible at: http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/ American Museum of Natural History, New York, USA. Acessado em 12 de fevereiro de 2009.
- Funk WC, Blouin MS, Corn PS, Maxell BA, Pilliod DS, Amish S, Allendorf FW (2005)Population structure of Columbia spotted frogs (*Rana luteiventris*) is strongly affected by the landscape. Molecular Ecology 14: 483-496.
- Grant T, Frost DR, Caldwell JP, Gagliardo R, Haddad CFB, Kok PJR, Means DB, Noonan BP, Schargel WE, Wheeler WC (2006) Phylogenetic systematic of dart poison frogs and their relatives (Amphibia: Athesphatanura: Dendrobatidae).
 Bulletin of American Museum of Natural History 299: 1-262.

- Gonzalez Z, Ray DA, Mcaliley R, Gray MJ, Perchellet C, Smith LM, Densmore LD (2004) Five polymorphic microsatellite markers for the Great Plains toad, *Bufo cognatus*. Molecular Ecology Notes 4: 9-10.
- Hancock JM (1999) Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. *In*: Microsatellites: Evolution and Applications (eds Goldstein, D.B., Schlötterer, C.) pp. 1-9. Oxford University Press, Oxford.
- Hartl DL, Clark AG (1997) Principles of Population Genetics. 3 ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 542 pp.
- Hedrick PW (2005) A standardized genetic differentiation measure. Evolution 59: 1633-1638.
- Hödl W (1990) An analysis ecology of foam nest construction in the neotropical frog *Physalaemus ephippifer* (Leptodactylidae). Copeia 1990: 547–554.
- Jarne P, Lagoda PJL (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. Trends in Ecology and Evolution 11:424-429.
- Johansson M, Primmer CR, Merilä J (2007) Does habitat fragmentation reduce fitness and adaptability? A case study of the common frog (*Rana temporaria*). Molecular Ecology 16: 2693-2700.
- Jones AG, Ardren WR (2003) Methods of parentage analysis in natural populations. Molecular Ecology 12: 2511-2523.
- Katti MV, Ranjekar P, Gupta VS (2001) Differential distribution of simple sequence repeats in eukaryotic genome sequences. Molecular Biology and Evolution 18: 1161-1167.

- Kelkar YD, Tyekucheva S, Chiaromonte F, Makova KD (2008) The genome-wide determinants of human and chimpanzee microsatellite evolution. Genome Research 18: 30-38.
- Kimmel M, Chakraborty R, Stiverst DN, Deka R (1996) Dynamics of repeat polymorphisms under a forward-backward mutation model: within- and betweenpopulation variability at microsatellite loci. Genetics 143: 549-555.
- Kimura M, Crow JF (1964) The number of alleles that can be maintained in a finite population. Genetics 49: 725-738.
- Kimura M, Ohta T (1978) Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. Proceedings of the National Academy of Science of the USA 75: 2868-2872.
- Lai Y, Sun F (2003) The relationship between microsatellite slippage mutation rate and the number of repeat units. Molecular Biology and Evolution, 20: 2123–2131.
- Lampert KP, Rand S, Mueller UG, Ryan MJ (2003) Fine-scale genetic pattern and evidence for sex-biased dispersal in the túngara frog, *Physalaemus pustulosus*.
 Molecular Ecology 12: 3325 –3334.
- Levinson G, Gutman GA (1987) Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. Molecular Biology and Evolution 4: 203-221.
- Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo, E (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. Molecular Ecology 11: 2453-2465.
- Lourenço LB, Recco-Pimentel SM, Cardoso AJ (1999) Two karyotypes and heteromorphic sex chromosomes in *Physalaemus petersi* (Leptodactylidae, Anura). Can. J. Zool 77: 624-631.

- Monsen KJ, Blouin MS (2003) Genetic structure in a montane ranid frog: restricted gene flow and nuclear-mitochondrial discordance. Molecular Ecology 12: 3275-3286.
- Morehouse EA, James TY, Ganley ARD, Vilgalys R, Berger L, Murphy PJ, et al. (2003) Multilocus sequence typing suggests the chytrid pathogen of amphibians is a recently emerged clone. Molecular Ecology 12: 395-403.
- Morgan MJ, Hunter D, Pietsch R, Osborne W, Keogh JS (2008) Assessment of genetic diversity in the critically endangered Australia corroboree frogs, *Pseudophryne corroboree* and *Pseudophryne pengilleyi*, identifies four evolutionarily significant units for conservation. Molecular Ecology 17: 3448- 3463.
- Nascimento LB, Caramaschi U, Cruz CAG (2005) Taxonomic review of the species groups of the genus *Physalaemus* Fitzinger, 1826 with revalidation of the genera *Engystomops* Jiménez de-La-Espada, 1872 and *Eupemphix* Steindachner, 1863 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). Arquivos do Museu Nacional do Rio de Janeiro 63: 297-320.
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Science of the USA 70: 3321-3323.
- Neigel JE (2002) Is FST obsolete? Conservation Genetics 3: 167-173.
- Newman R, Squire T (2001) Microsatellite variation and fine-scale population structure in the wood frog (*Rana sylvatica*). Molecular Ecology 10: 1087-1100.
- Nielsen R, Palsboll PJ (1999) Single-locus tests of microsatellite evolution: multi-step mutations and constraints on allele size. Molecular Phylogenetics and Evolution 11: 477-484.

- Oliveira EJ, Pádua JG, Zucchi MI, Vencovsky R, Vieira MLC (2006) Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. Genetics and Molecular Biology 29: 294-307.
- Pounds JA, Bustamante M R, Coloma LA, Consuegra JA, Fogden MPL, Foster PN, La Marca E, Masters KL, Merino-Viteri A, Puschendorf R, Ron SR, Sánches-Azofeifa A, Still CJ, Young BE (2006) Widespread amphibian extinction from epidemic disease driven by global warming. Nature 439: 161-167.
- Pröhl H, Adams RMM, Mueller U, Rand S, Ryan MJ (2002) Polymerase chain reaction primers for polymorphic microsatellite loci from the túngara frog *Physalaemus pustulosus*. Molecular Ecology 2: 341-343.
- Quinderé YRSD, Lourenço LB, Andrade GV, Tomatis C, Baldo D, Recco-Pimentel SM (2009) Polytypic and polymorphic cytogenetic variations in the widespread anuran *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leiuperidae) with emphasis on nucleolar organizing regions variability. Biological Research. 42: 79-92.
- Quinderé YRSD, Lourenço LB, Tomatis C, Baldo D, Vittorazzi SE, Lima JF, Recco-Pimentel SM (2009) Cytogenetics of species of *Physalaemus cuvieri* group (Anura, Leiuperidae), with the description of an intriguing heteromorphism in *P. ephippifer*.
 Em preparação.
- Rowe G, Beebee TJC, Burke T (2000) A microsatellite analysis of natterjack toad, *Bufo calamita*, metapopulations. Oikos 88: 641-651.
- Schlötterer C, Tautz D (1992) Slippage synthesis of simple sequence DNA. Nucleic Acids Research 20(2): 211-215.
- Seppä P, Laurila 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 canorus* (Anura, Bufonidae) based on single-strand conformation polymorphism analysis (SSCP) and mitochondrial DNA sequence data. Molecular Ecology 9: 245-257.
- Silva APZ, Haddad CFB, Kasahara S (1999) Nucleolus organizer regions in *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae), with evidence of a unique case of Ag-NOR variability. Hereditas 131: 135-141.
- Slatkin M (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. Genetics 139: 457-462.
- Storfer A (2003) Amphibian declines: future directions. Diversity and Distributions 9: 151-163.
- Stuart SN, Chanson JS, Cox NA, Young BE, Rodrigues ASL, Fischman DL, Waller RW (2004) Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. Science 306: 1783–1786.
- Telles MPC (2005) Estrutura genética populacional de *Physalaemus cuvieri* Fitzinger 1826 (anura: Leptodactylidae) e padrões de ocupação humana no estado de Goiás. *Tese de doutorado* (Ciências Ambientais), Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO.135p.
- Telles MPC, Bastos RP, Soares TN, Resende LV, Diniz-Filho JAF (2006) RAPD variation and population genetic structure of *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leptodactylidae) in Central Brazil. Genetica 128: 323-332.
- The IUCN Red List Threatened Species. Banco de dados eletrônico disponível em: http://www.iucnredlist.org/ Acessado em 20 de maio de 2009.

- Tóth G, Zoltán-Gáspári Z, Jurka J (2000) Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. Genome Research 10: 967-981.
- Toledo LF, Britto FB, Araújo OGS, Giasson LMO, Haddad CFB (2006) The occurrence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazil and the inclusion of 17 new cases of infection. South American Journal of Herpetology 13: 185-191.
- Torres TT (2006) Variabilidade genética e estrutura de populações de *Cochliomyia hominivorax* (Díptera: Calliphoridae): uma nova perspectiva através de marcadores microssatélites. Tese de doutorado, Instituto de Biologia, Unicamp, Campinas, SP. 138p.
- Vicente VE, Bertollo LAC, Valentini SR, Moreira O (2003) Origin and differentiation of a sex chromosome system in *Paradon hilarii* (Pisces, paradontidae). Satellite DNA, G- and C-banding. Genetica 119: 115-120.
- Zane L, Bargelloni L, Patarnello T (2002) Strategies for microsatellite isolation: a review. Molecular Ecology 11: 1-16.
- Zeisset I, Rowe G, Beebee TJC (2000) Polymerase chain reaction primers for microsatellite loci in the north European water frogs *Rana ridibunda* an *R. lessonae*.Molecular Ecology 9: 1171-1193.
- Whitlock MC, McCauley DE (1999) Indirect measures of gene flow and migration: $F_{ST} \neq 1/(4Nm+1)$. Heredity 82: 117-125.
- Wogel H, Abrunhosa PA, Pombal JP (2002) Atividade reprodutiva de Physalaemus signifer (Anura, Leptodactylidae) em ambiente temperário. Iheringia, Série Zoologia 92 (2): 57-70.
- Wright S (1951) The genetical structure of populations. Annual Eugenics 15: 321-354

4. ARTIGOS
Conserv Genet DOI 10.1007/s10592-009-9832-1

TECHNICAL NOTE

Isolation and characterization of polymorphic microsatellites for the natural populations of barker frog *Physalaemus cuvieri*

M. Conte · L. J. Cançado · P. R. Laborda · M. I. Zucchi · G. V. Andrade · D. C. Rossa-Feres · S. Siqueira · A. P. Souza · S. M. Recco-Pimentel

Received: 12 January 2009/ Accepted: 19 January 2009 © Springer Science+Business Media B.V. 2009

Abstract Ten polymorphic microsatellite loci were isolated for *Physalaemus cuvieri* from a GA—CA enriched library. In 160 *P. cuvieri* individuals, the number of alleles per locus ranged to 2–9 and the expected heterozygosity ranged from 0.30 to 0.85. The primers were successfully cross-amplified in the congeneric species *P. albonotatus*, *P. ephippifer* and *Physalaemus* cf. *cuvieri*, suggesting that these loci are potentially useful for studies on population genetic structure of *Physalaemus* sp.

Keywords *Physalaemus* · Leiuperidae · Barker frog · Microsatellite · Molecular makers

M. Conte · S. Siqueira · S. M. Recco-Pimentel (⊠) Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia (IB), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo 13083-970, Brazil e-mail: shirlei@unicamp.br

L. J. Cançado - P. R. Laborda - A. P. Souza Departamento de Genética, Instituto de Biologia (IB) e Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo 13083-970, Brazil

M. I. Zucchi

Laboratório de Biologia Molecular, Centro de Recursos Genéticos, Instituto Agronômico de Campinas (IAC), Campinas, São Paulo 13083-970, Brazil

G. V. Andrade

Departamento de Biologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão 65085-580, Brazil

D. C. Rossa-Feres

Departamento de Zoologia e Botânica, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio Preto, São Paulo 15054-000, Brazil

Published online: 04 February 2009

Amphibian populations have decreased in the entire world to such a degree that 32% of the amphibian species are presently listed as endangered; therefore they are considered vulnerable to environmental changes (Stuart et al. 2004). Certainly, knowledge about temporal and spatial dynamics of amphibian populations is fundamental for their effective conservation. However, in spite of their importance these studies are still incipient in many anuran taxa. Frogs of the genus Physalaemus are extensively distributed in the Neotropical region. This genus is considered to be composed of polymorphic and cryptic species (Barrio 1965; Frost 2008), thus hindering proper identification of populations. The Physalaemus was recently included in the Leiuperidae family (Grant et al. 2006) and presently comprises 42 species (Frost 2008). The species Physalaemus cuvieri is widely distributed in South America, occurring in a large area in Brazil throughout the northeastern, central and southern regions. Several reports on P. cuvieri revealed intraspecific morphological variation and cytogenetic analysis have demonstrated intra- and interpopulational chromosome variation in the number and localization of NOR (Silva et al. 1999; Y.R.S.D. Quinderé, unpublished data). A few primers for microsatellite have been developed for amphibians, but their use in studies of population genetic structure and of behavioral and conservation biology of anurans is still rare (Pröhl et al. 2002). Microsatellites could be greatly valuable to the understanding of the genetic structure of P. cuvieri populations.

Physalaemus cuvieri individuals (n = 160) were sampled in ten regions of Brazil and comprised: three populations from the northeast region, in São Pedro da Água Branca and Urbano Santos, both in Maranhão State, with 13 and 15 individuals each, and in Vitória da Conquista, Bahia State, with 16 individuals; one population from the northern region, in Porto Nacional, Tocantins

2 Springer

Table 1	Characterizati	ion of ten	polymorphic microsatellite loci for Physalae	nus cuvie	rri genot	yped i	n 160 i	ndividu	tals from	0 Brazilian p	opulation	s, and mor-	e three speci	es of Phys	alaemus
Locus	GenBank	Repeat	Primer sequences 5'-3'	$T_{\rm a}$	Allele	$N_{\rm a}$	$H_{\rm o}$	$H_{\rm e}$	P-HWE	Cross-ampl	ification				
	accession numbers	motif		(c)	size (pb)					$N_{ m a}$			$H_{\rm o}$		
					5					P. cf. cuv	P. ephi	P. albo	P. cf. cuv	P. ephi	P. albo
PIA10	EU718357	$AC_{(5)}$	F: ACAGCTTACACAGGCATACAAA R: GAGGAGCAAGAAGTCAGGTG	64.6	314	6	0.28	0.85	+*0000	4	4	2	0.373	0.373	0.173
P3A12	EU343729	$\mathrm{TG}_{(7)}$	F: GCTCCTCCACACATTCA	56.7	200	ŝ	0.86	0.5	*0000	2	2	1	0.518	0.518	0.000
DEAQ	EI13/3730	V.J	R: TATTTTCTCCCACTTATCACAA E: CAGGAAAGGGACATGAGAAGAG	1 75	310	e	0.64	0 53	*0000	ç	ç	ç	0.137	0.137	0 573
rovo	00/04003	(6) V	R: GGACCCCAAGCCAAACTG	1.00	010	n	0.04	70.0	-0000	7	7	4	161.0	101.0	C7C.U
P9C1	EU343731	CA(11)	F: GGGCAGGGTGGGAGGAAG	64.6	161	3	0.98	0.54	*0000	2	2	4	0.518	0.518	0.000
			R: GGCAAGGGGGAAAGCAAATA												
P12D1	EU343732	$AC_{(6)}$	F: CTCAGGCTTCACTCTTTCAA	48.0	148	6	0.23	0.82	+*0000	2	2	1	0.253	0.253	0.000
			R: ACACGGTCAGCGCAGGTAAT												
P13A5	EU343724	$AC_{(8)}$	F: GGGGGCTATCTTCTTCCTTTTA	56.7	198	9	0.31	0.76	*0000	2	2	1	0.304	0.304	0.000
			R: GCGATTTGCCTCACACCAT												
P17B10	EU343725	$CA_{(7)}$	F: ACGTAAGGGTGGGAATGGTGTT	56.7	309	2	0.70	0.72	0.069	I	I	1	0.000	0.000	0.000
			R: CAGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG												
P20D4	EU343726	$AG_{(5)}$	F: CAATCGTAATGACAATAAAAA	56.7	234	6	0.42	0.86	0.015	5	5	2	0.614	0.614	0.173
			R: AGTGAACTAATCCAATGCTA												
P21D10	EU343727	CA(6)	F: CAAGGGGGAAAAGCAAATACA	56.7	215	5	0.37	0.30	0.002*	2	2	1	0.137	0.237	0.000
			R: GGGAAAGGGACCTGAGAAGAG												
P22C9	EU343728	$GT_{(6)}$	F: TGAGCAGCCAGAACACAAAG	56.7	226	9	0.40	0.77	*0000	4	4	NA	0.468	0.468	NA
			R: TCCACCCCGACTCTAACTGA												
										$H_{\rm e}$			P-HW		8
										P. cf. cuv	P. ephi	P. albo	P.cf. cuv	P. ephi	P. albo
P1A10	EU718357	AC ₍₅₎	F: ACAGCTTACACAGGCATACAAA	64.6	314	6	0.28	0.85	+*0000	0.142	0.142	0.181	1.000	NT	1.000
			R: GAGGAGCAAGAAGTCAGGTG												
P3A12	EU343729	$TG_{(7)}$	F: GCTCCTCCACACATTCA	56.7	200	ю	0.86	0.5	*0000	1.000	1.000	0.000	1.000	NT	NT
			R: TATTITICTCCCACTTATCACAA												
P6A8	EU343730	CA ₍₉₎	F: CAGGAAAGGGACATGAGAAGAG	56.7	310	ю	0.84	0.52	*0000	0.142	0.142	1.000	LN	1.000	0.003
			R: GGACCCCAAGCCAAACTG												
P9C1	EU343731	CA(11)	F: GGGCAGGGTGGGAGGAAG	64.6	161	ŝ	0.98	0.54	*0000	1.000	1.000	0.000	1.000	1.000	ΓN
			R: GGCAAGGGGGAAAGCAAATA												
P12D1	EU343732	AC ₍₆₎	F: CTCAGGCTTCACTCTTTCAA	48.0	148	6	0.23	0.82	+*0000	0.000	0.000	0.000	NT	1.000	NT
			R: ACACGGTCAGCGCAGGTAAT												

Table 1 continued

									1.100			WH-1		
									P. cf. cuv	P. ephi	P. albo	P.cf. cuv	P. ephi	P. albo
PI3A5	EU343724	AC(8)	F: 66666CTATCTTCTTCCTTTTA 567 R: 6C6ATTTGCCTCACACCAT	198	9	0.31	0.76	*0000	0.377	0.357	0.000	IN	NT	IN
P17B10	EU343725	$CA_{\mathcal{O}}$	F: ACGTAAGGGTGGGGAATGGTGTT 56.7 R: CAGGGGAGGGGTGTTGGTG	309	7	0.70	0.72	0.069	0.000	0.000	0.000	NT	NT	IN
P20D4	EU343726	$\mathrm{AG}_{(5)}$	F: CAATCGTAATGACAATAAAAA 56.7 R: AGTGAACTAATCCAATGCTA	234	6	0.42	0.86	0.015	0.222	0.222	0.181	1.000	NT	1.000
P21D10	EU343727	CA(6)	F: CAAGGGGGAAAAGCAAATACA 56.7 R: GGGAAAGGGACCTGAGAAGAG	215	2	0.37	0.30	0.002*	0.142	0.142	0.000	1.000	NT	IN
P22C9	EU343728	$GT_{(6)}$	F: TGAGCAGCCAGAACACAAAG 56.7 R: TCCACCCCGACTCTAACTGA	226	9	070	0.77	*0000	0.214	0.214	NA	Υ	N	NA

State, with 21 individuals; four populations from the southeastern region in Uberlândia, Minas Gerais State, with 16 individuals, and in Vitória Brasil, Palestina and Nova Itapirema, in São Paulo State, with 14, 17 and 12 individuals, respectively; one population from the middleeastern region, in Chapada dos Guimarães, Mato Grosso State, with 17 individuals; and one from the southern region, in Passo Fundo, Rio Grande do Sul State, with 19 individuals. DNA samples were extracted using the Genomic Prep Cells and Tissues DNA Isolation Kit (Amersham Pharmacia Biotech), and the TNES method (Tris, NaCl, EDTA, SDS) (adapted by Martins and Bacci 2001).

A microsatellite-enriched library was obtained for *P. cuvieri*, using protocols adapted (Billote et al. 1999). The genomic DNA was digested with RSA *I* and enriched in (CT)₈ and (GT)₈ repeats. Enriched fragments were amplified by polymerase chain reaction (PCR), ligated into a p-Gem T Easy vector (Promega) and then transformed into competent XL1-blue *Escherichia coli* cells. The positive clones were selected using the β —galactosidase gene and then grown overnight in an HM/FM medium with ampicilin. After PCR, positive clones were sequenced in both directions using the T7 and SP6 primers as well as the v3.1 Big Dye terminator kit (PerkinElmer Applied Biosystems) with an ABI PRISM[®] 377.

Twenty-four primer pairs complementary to sequences flanking the repeat motifs were designed using the DNA STAR software. PCR amplifications were performed in a 25 µl reaction volume using PTC-200 (MJ Research). Final concentrations for optimizing reactions were 1× PCR buffer, 1.5 mM MgCl2, 0.3 mM of each dNTP (Invitrogen), 0.3 mM of each primer, 1U Taq DNA polymerase (Invitrogen) and 10 ng of genomic DNA. After an initial denaturing step of 3 min at 94°C, PCR amplification was performed in 39 cycles of 30 s at 93°C, 1 min at the specific annealing temperature of each primer pair (Table 1), and 1 min at 72°C, followed by a final extension at 72°C for 5 min. The PCR products were visualized on 3.0% agarose gel electrophoresis. Ten polymorphic loci were successfully amplified. The PCR products were resolved on 6% denaturing polyacrylamide gels and the alleles visualized by silver nitrate staining, using 10pb ladder (Invitrogen) as size standard. The GDA software (Lewis and Zaykin 2000) was used to analyze the gametic-disequilibrium and to estimate the heterozygosity for all loci and populations. The number of alleles per locus ranged from 2 to 9 alleles per locus, with expected heterozygosity (He ranged to 0.30-0.85) and observed heterozygosity (Ho ranged to 0.22-0.98) (Table 1). Null alleles frequencies among the loci and across populations were estimated using Micro-Checker 2.2.3 (Van Oosterhout et al. 2004). The Tools for Genetic Population Analysis (TFPGA) (Miller 1997) software was

used for the Hardy–Weinberg proportions test regarding the ten loci and the populations.

In eight of all loci, the observed and expected heterozygosity values did not conform to HW expectations after Bonferroni correction (P < 0.005), and only the P17B10 and P20D4 loci reflected the adherence of HWE model. Such deviations from Hardy-Weinberg proportions are probably due to one or a combination of factors including insufficient sample size, substructuring of the sample (i.e., Wahlund effect), inbreeding or presence of sibling in the sample. No significant gametic-disequilibrium was observed for pairs of loci after Bonferroni correction. The Micro-Checker 2.2.3 software (Van Oosterhout et al. 2004) was used to test presence of null alleles, which was suggested to occur in the loci P1A10 and P12D1. The level of polymorphism for these ten loci indicated that, in combination, they should provide high resolution for assessing the genetic structure of P. cuvieri.

In addition, to characterizing the variability of the ten loci in P. cuvieri, cross-amplifications were done, using the experimental protocols herein described, in order to test their applicability in three other Physalaemus sp.: Physalaemus cf. cuvieri population (from Crateús, Ceará State, with 14 individuals); P. ephippifer (from Belém, Pará State, with 15 individuals); and P. albonotatus (from Cárceres, Mato Grosso State, with 11 individuals), Results of the cross-amplification tests are shown in Table 1. The ten characterized loci were useful to study those sibling species of the Physalaemus genus. The locus P22C9, however, did not show amplification for the P. albonotatus population under the experimental conditions of this work. Data demonstrated that the microsatellite loci characterized in this work are potentially useful as markers in studies on population genetic structure of P. cuvieri as well as of other Physalaemus sp. from diverse regions in Brazil.

Acknowledgments The authors gratefully acknowledge Carmen S. Busin for helping with frog sampling in the Rio Grande do Sul State. This project was supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) with grant (06/59697-7) award to SMRP and graduate fellowship to PRL, by CNPq (Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico) with research fellowships to APS and SMRP, by FUNDECT (Fundação para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico de Mato Grosso do Sul) with graduate fellowship to LJC, and by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) with graduate fellowship to MC. The specimens were collected with authorization from the Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Renováveis (IBAMA—Proc. 02001.002001/2005-27 and 02010.002895/2003).

References

- Barrio A (1965) El gênero Physalaemus (ANURA, Leptodactylidae) en la Argentina. Physis 25:421–448
- Billote N, Lagoda PJ, Risterucci AM, Baurens FC (1999) Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. Fruits 54:277–288
- Frost DR (2008) Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.2. Available from http://research.amnh. org/herpetology/amphibia/index.php/ (15 July 2008). Am Mus Nat Hist, New York. Accessed 10 September 2008
- Grant T, Frost DR, Caldwell JP et al (2006) Phylogenetic systematic of dart poison frogs and their relatives (Amphibia: Athesphatanura: Dendrobatidae). Bull Am Mus Nat Hist 299:1–262. doi: 10.1206/0003-0090(2006)299[1:PSODFA]2.0.CO;2
- Lewis PO, Zaykin D (2000) Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d15) Free program distributed by authors over the Internet from the GDA. http://alleyn.eeb.uconn.edu/gda/2000
- Martins VG, Bacci Jr M (2001) Métodos moleculares para o estudo do DNA I—Extração e Amplificação de DNA. Protocolos. Centro de Estudos de Insetos Sociais, UNESP/Rio Claro
- Miller MP (1997) Tools for population genetic analysis (TFPGA) 1.3. A windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author
- Pröhl H, Adams RMM, Mueller U, Rand S, Ryan MJ (2002) Polymerase chain reaction primers for polymorphic microsatellite loci from the tungara frog *Physalaemus pustulosus*. Mol Ecol 2:341–343. doi:10.1046/j.1471-8286.2002.00240.x
- Silva APZ, Haddad CFB, Kasahara S (1999) Nucleolus organizer in *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae), with evidence of a unique case of Ag-NOR variability. Hered 131:135–141. doi: 10.1111/j.1601-5223.1999.00135.x
- Stuart SN, Chanson JS, Cox NA et al (2004) Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide, Sci 306:1783– 1786. doi:10.1126/science.1103538
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DP, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Mol Ecol Notes 4:535– 538. doi:10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x

Springer

4.2. Artigo 2

Population genetic structure of the Neotropical frog *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leiuperidae) in diverse regions of Brazil

M. Conte*^{,+}, A. P. Souza⁺, M. I. Zucchi[#], S. M. Recco-Pimentel*

*Departamento de Anatomia, Biologia Celular e Fisiologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 13083-863 Campinas, São Paulo, Brazil ⁺Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970 Campinas, São Paulo, Brazil [#]Centro de Recursos Genéticos, Instituto Agronômico de Campinas, 13012-970 Campinas, São Paulo, Brazil

Correspondence: Shirlei M. Recco-Pimentel; Fax: +55 19 35216185; e-mail: shirlei@unicamp.br

Abstract

The genetic structure of ten Brazilian natural populations of the Neotropical frog Physalaemus cuvieri was investigated using ten polymorphic microsatellite loci. The genetic variation was significant in most of the populations ($H_E = 0.40$ to 0.59 and allelic richness = 2.07 to 3.54). Restricted overall gene flow among the *P. cuvieri* populations (Nm < 1.0) and $F_{ST} = 0.27$ indicated high genetic structure among populations. STRUCTURE analyses grouped the ten P. cuvieri populations in nine clusters and indicated that only two of the populations were not genetically differentiated. A population from the northeastern state of Maranhão (MA1) and another from the southeastern state of São Paulo (SP7) have likely gone through a recent bottleneck effect. Two populations, from Porto Nacional (TO) and Passo Fundo (RS) were divided in two sets of individuals each one. Part of Porto Nacional individuals were clustering with *P. cuvieri* from Uberlândia (MG), and the second part grouped with individuals from Vitória da Conquista (BA), indicating that these individuals have some similar alleles. Part of RS10 individuals were clustered together with the Vitória Brasil (SP) population. The remaining RS10 specimens formed an isolated group, suggesting the presence of private alleles, suggesting that these individuals may belong to different species not analyzed here. The present data on genetic structure of P. cuvieri populations contribute to improving knowledge on the genetic variability of this species, as well as for future ecological and conservation guidelines.

Keywords: Physalaemus, barker frog, microsatellite, population structure

Introduction

The *Physalaemus* genus was included in the Leiuperidae family by Grant et al. (2006). Currently, there are 45 species in this genus, which are widely distributed in South America. *Physalaemus* species are found from the central and northern regions of Argentina to eastern Bolivia, Paraguay, Uruguay, Brazil and the Guyanas, lowlands in southern Venezuela, llanos in southeastern Colombia and western Ecuador (Frost 2009). The *P. cuvieri* group (*sensu* Nascimento et al. 2005) comprises the species *P. albonotatus*, *P. centralis*, *P. cicada*, *P. cuqui*, *P. cuvieri*, *P. ephippifer*, *P. erikae*, *P. fischeri* and *P. kroyeri* (Frost 2009). *P. cuvieri* has been considered a sibling species of *Physalaemus albonotatus* and *Physalaemus centralis* (Barrio 1965; Frost et al. 2009).

The species *P. cuvieri* is widely distributed in South America including all regions of Brazil, Misiones in Argentina, eastern Paraguay, Departments of Beni and Santa Cruz in Bolivia and possibly lowlands of southern Venezuela (Frost 2009). In Brazil, *P. cuvieri* occurs in a large area (Global Amphibian Assessment 2009) and intraspecific morphological variation has been reported in Brazilian populations (Nascimento et al. 2005).

Physalaemus cuvieri populations have been studied by Telles (2005) and Telles et al. (2006) using RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) and cytogenetically by Silva et al. (1999) and Quinderé et al. (2009). These authors described intra- and interpopulational chromosome variation for number and localization of nucleolar organizer regions (NOR). The previously cytogenetic studied *P. cuvieri* populations from the northeastern and southeastern regions of Brazil differ regarding their breeding period, even though they share the same reproductive biology (Barreto and Andrade 1995). However, until now, do not exist any populations study involving this species

using the microsatellites markers and consequently is lacking knowledge of genetic structure to *P. cuvieri* species.

Knowledge on temporal and spatial dynamic of populations and the understanding of magnitude and patterns of their genetic diversity are essential for assisting efforts attempting to maintain evolutionarily viable species (Avise 2004; Telles et al. 2006).

Some authors (Rowe et al. 2000; Silva et al. 2007) reported limited vagility to amphibians and many species maintain high fidelity to the local breeding, thus contributing to lowering gene flow among their populations. Hence, the low gene flow due to habitat fragmentation coupled with low vagility and decline of anuran species affects genetic diversity of these populations (Arens et al. 2006; Silva et al. 2007).

In *P. cuvieri*, ten polymorphic microsatellite loci were recently isolated from a GA-CA enriched library (Conte et al. 2009), enabling studies on population genetic structure of this species. In the present work, these polymorphic microsatellite loci were used to assess the genetic diversity and genetic structure of ten *P. cuvieri* populations from various regions of Brazil, and further to contribute to the knowledge on this anuran species.

Materials and methods

Populations sampling and DNA extraction

Physalaemus cuvieri specimens (n=160) were sampled in ten diverse localities of Brazil as shown in Figure 1 and Table 1. The ten populations were chosen in an attempt to sample biggest number of Brazilian regions as much as possible, including those that have previously shown cytogenetic variation. Genomic DNA samples (liver, heart and/or muscle) were extracted using the Genomic Prep Cells and Tissues DNA Isolation Kit (Amersham Pharmacia Biotech), and TNES method (Tris, NaCl, EDTA and SDS) following the protocol of Martins and Bacci-Jr (2001).

Microsatellite analysis

The ten *P. cuvieri* microsatellite loci described by Conte et al. (2009) were used for genetic analyses of *P. cuvieri* populations. The microsatellite loci are named: P1A10, P3A12, P6A8, P9C1, P12D1, P13A5, P17B10, P20D4, P21D10 and P22C9.

PCR amplifications were performed according to Conte et al (2009). The PCR products were visualized on 3% agarose gel electrophoresis. The amplification products were separated by electrophoresis on 6% denatured polyacrylamide gels and silver stained. Fragment sizes were determined by comparison with 10 bp ladder (Invitrogen) as size standard (Creste et al. 2001).

Data analysis

Genetic differentiation among populations was estimated using the F_{ST} statistic (Wright 1951). The gene flow was expressed by $Nm=\frac{1}{4}$ (1/Fst – 1), (Wright 1951). The Geographic Distance Matrix Generator (http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/gdmg/) was used to calculate all pairwise distances among the 10 populations from a list of geographic coordinates. The expected and observed heterozygosities, private alleles and Nei's genetic distance (Nei 1978) were estimated using GDA (Lewis and Zakin 2000). The FSTAT software (Goudet 1995) was used to calculate the F_{ST} pairwise among the populations through Nei's F-statistics and Weir and Cockerham's estimator of F_{IS} (f - inbreeding coefficient) in order to investigate possible deviations from the Hardy-Weinberg equilibrium and allelic richness means.

Evidence for a possibility of recent population bottleneck was examined using BOTTLENECK 1.2.02 (Cornuet and Luikart 1996). The bottlenecked allelic diversity is lost faster than heterozygosity, resulting in the observed number of alleles being less than the number expected from the observed Hardy-Weinberg heterozygosity (Cornuet and Luikart 1996). Assuming mutation-drift equilibrium conditions, the significance of heterozygosity excess was evaluated for each of 10 populations. The Wilcoxon test was used to estimate the concordance of expected heterozygosity (H_e) and expected equilibrium heterozygosity (H_{eq}). This test verifies if there was a recent reduction in population effective size and exhibits a correlative reduction of allele numbers and gene diversity at polymorphic loci using the two phase model, as recommended for microsatellite loci with 30% infinite allele model and 70% stepwise mutation model.

The number of clusters was estimated using the software STRUCTURE (Pritchard et al. 2000). STRUCTURE was performed with a burn-in length of 100,000 and MCMC repeats of 100,000, with 10 iterations for each K. The possible Ks ranged from 2 to 10. The identification of distinct cluster number (K) was performed following the procedure described by Evanno et al. (2005), which examines the second order rate of change of the log probability of data with respect to the number of clusters. Possible correlation between geographic and genetic distances was evaluated through a test for isolation by distance (Isold) using GENEPOP 4.0, (Raymond and Rousset 1995), from F_{ST} values and geographic distances (Km).

Results

Genetic variation

The H_E per population ranged from 0.402 in SP7 to 0.597 in RS10. As for the H₀ mean per population, the range was from 0.417 in TO3 to 0.803 in MA1. Allelic richness varied from 2.070 to 3.543 (Table 2). The overall inbreeding coefficient was f= -0.11 (CI 95%). The dominance of negative *f*-values *per* populations (Table 2) showed excess of heterozygotes due sampling (favorable heterozygotes selection) and may indicate that there is no inbreeding. Private alleles were present in two loci of the population RS10 and in one locus of SP5.

Genetic diversity and differentiation

The overall F_{ST} value indicated 27.1% of genetic variation among the populations. Pairwise F_{ST} values ranged from 0.076 between TO3 and BA9 up to 0.428 between MA2 and SP6 populations (Table 3). The overall gene flow, considering historical, from the F_{ST} value was Nm= 0.675, which indicates restricted gene flow with no more than one migrant for generation, admitting the island model. The estimate number of migrants (Nm) varied from 0.33 between populations MA2 and SP6, up to 3.03 between TO3 and BA9.

The STRUCTURE analysis revealed a ΔK max of 56.31 and K=9 (data not shown), and clustered the 10 presents populations in 9 groups (Figure 2). The population clustering probabilities are listed in Table 4 and letters A to I symbolize the clusters. Of 160 individuals, 91 (56.8%) were assigned to a cluster with a probability \geq 0.90. In the SP5 and SP6 populations, 18 individuals out of 91 (19.7%) were grouped in the same cluster. Only the SP7 population had all 12 individuals (100%) assigned to a

single cluster. The clustering of the 10 *P. cuvieri* populations is represented in Figure 2, in which the groups are distinguished by colors.

The individuals of the other populations showed significant probabilities assignment in the same STRUCTURE clusters, but not exclusively (data not shown).

Bottleneck and distances

The Wilcoxon test performed by BOTTLENECK 1.2.02 software revealed an excess of heterozygosity compared to the expected equilibrium in the populations MA1 (P=0.018) and SP7 (P=0.097) indicating that two populations have been experimented a recent reduction in number of individuals.

The test for isolation by distance showed not significant correlation between genetic and geographic distances, as shown by r=0.20, with 1,000 permutations, using the Spearman Rank correlation coefficient (Figure 3). Nei's distance (Nei 1978) was estimated as 0.092 between SP5 and SP6, and 0.8483 between SP6 and MT8. The minor geographic distance was 99.41 km, between SP6 and SP7, and the major distance was 2936.75 km between MA2 and RS10 (Table 5).

Discussion

Genetic variation and gene flow

The microsatellite markers used in this work were previously examined through the number of alleles, null alleles, observed and expected heterozygosity and deviations from the Hardy-Weinberg equilibrium (Conte et al. 2009). The dominance of negative *f*values, found in this present work is similar to others anuran studies. Schmeller and Merilä (2007) showed that some negative values of inbreeding index for *Rana* *temporaria* populations indicate a favorable heterozygote selection. Seppä and Laurila (1999) found average *f*-values equaled zero in *Rana temporaria* and *Bufo bufo* populations showing that do not exist indication of inbreeding to these species. Thus, *P. cuvieri* populations indicated an apparent excess of heterozygotes (probably due to sampling) and do not showed inbreeding to the most of populations sampled indicating to be a panmictic populations.

In the present work, the high global F_{ST} value (0.27) indicated an important genetic differentiation among of *P. cuvieri* populations. As expect for this work, the gene flow among *P. cuvieri* populations found (*Nm*=0.67) was restricted in a step-stone model, probably due the geographic distance among the populations sampled. The data demonstrated that this gene flow has not been enough to keep the cohesion of *P. cuvieri* populations and the gene flow values found here were more significant in the analysis of geographic pairwise population. Patterns of genetic variation reveal the events of the past, like this, if gene flow and isolation by distance are not observed, it is more likely that the observed patterns are results of historical processes involving gene flow.

Telles et al. (2006), using RAPD markers, described F_{ST} =0.101 for 18 *P. cuvieri* populations from Central Brazil. In accordance with this results, they showed no significant correlation between geographic and genetic distances (r=0.109) with restricted gene flow among geographically close populations of *P. cuvieri*, and higher *Nm* values in their stipulated geographic classes.

Several works of genetic structure of other anuran species, the high F_{ST} values indicated low gene flow (*e.g.* Driscoll 1998a; Driscoll 1998b; Barber 1999; Kraaijeveld-Smit et al. 2005). As well as, lower F_{ST} values pointed more significative gene flow in

various anuran species, as *Bufo calamita* (Rowe et al. 2000), *Litoria aurea* (Burns et al. 2004) and *Rana arvalis* studied by Arens et al. (2007).

As expected, the correlation between genetic and geographic distances was not significant. The isolation by distance was estimated as r=0.2 and indicated that the geographic distance by itself does not explain the observed genetic variability among the *P. cuvieri* populations. The smallest geographic distance between populations studied here was 99.41 Km, which is superior to the geographic scales usually reported in studies of anuran (Kraaijeveld-Smit et al. 2005; Arens et al. 2006; Allentoft et al. 2008).

In general, for several species, studies on capture/recapture of animals uphold the idea that neighboring amphibian populations can interact through migration and gene flow (Berven and Grudzien 1990). However, amphibians exhibit strong fidelity to their habitats and have low dispersive capability (Funk et al. 2005). This behavior can contribute to restrict gene exchange among amphibian populations (Newman and Squire 2001; Burns et al. 2004).

To our knowledge, no other genetic study on *P. cuvieri* population is currently available that could allow a comparison with these results. However, the data of F_{ST} and respective gene flow showed to others anuran species are in accordance with the result found in this present work. The high variations levels to *P. cuvieri* populations corroborate with restrict gene flow found in this analysis.

The private alleles identified in RS10 and SP5 may indicate higher isolation in these populations. Of nineteen RS10 individuals, seven were sampled in 2006 and a few of them were clustered together with the SP5 population (Figure 2). The remaining twelve RS10 specimens were sampled in 2007, in the same pound and in the same

breeding season of the first collect. However, these twelve RS10 individuals were discriminated from five of the first specimens collected in 2006. They formed an isolated group, suggesting the presence of private alleles or maybe have some individuals from different species not analyzed here.

Genetic structure and bottleneck

The ten populations of *P. cuveri* were clustered in nine groups. In this way, the populations SP5 and SP6 were grouped together in the STRUCTURE analyses. They are from geographically closer (109.40 Km) regions in São Paulo state than other. On the other hand, even though SP7 is close to SP6 (99.4 Km distance), it was discriminated from the SP6 and the other populations (See fig 1 and table 4). The remaining populations were more highly structured, as MA1, MA2, MG4 and SP7. The STRUCTURE analysis revealed that exist similar alleles frequencies among individuals from TO3, MG4 and BA9 populations, as well as between individuals from BA9 and MT8 populations. The RS10 population (see figure 2) was separated in two sets of individuals, which seven were sampled in 2006, and twelve in 2007; and some of its individuals were grouped with the SP5 population, revealing that some individuals from these populations share similar alleles. The TO3 also was divided in two sets of individuals (see figure 2). Ten individuals were captured in 2004 in an open pasture area and 11 in 2007 in a forest. The sampling places were apart 50 m from each other. The first part of these individuals were grouped with P. cuvieri from Uberlândia (MG), however, the second part grouped with individuals from Vitória da Conquista (BA), indicating that these individuals have some similar alleles.

The data indicated that the MA1 and SP7 populations have likely gone through a recent reduction in their populations number, however, do not exist previous data about these two populations to confirm this result. Both populations were collected in degraded area with several disturbances as roads, eucalyptus and corn plantation. Additional studies on these populations and their environments will be helpful to compare landscape changes with genetic structure fluctuations. Many natural populations have experienced a bottleneck event resulting from over-exploitation, habitat destruction and fragmentation. Evaluations of effective size reduction of populations in number of individuals increase inbreeding and decrease genetic variation, leading to extinction risks (Luikart et al. 1998; Williamson-Natesan 2005).

Several studies showed that amphibians are highly philopatric (*i.e.* Berven and Grudzien 1990; Seppä and Laurila 1999; Manier and Arnold 2006) and some amphibian populations tend to become isolated (Shaffer et al. 2000). Consequently, amphibians are highly vulnerable to environmental degradation that can lead to menacing reduction of their population sizes (Ficetola and De Bernardi 2004). Small and isolated populations lose genetic variability (Johansson et al. 2007) and increased interpopulation distances induce relative isolation among local populations (Rowe et al. 2000).

The data described in the present study revealed high fidelity of the *P. cuvieri* populations to their breeding pond, based in the geographic scales used here, suggesting that they must be strongly philopatric and low vagility. The majority of the previous studies about population genetic structure of anurans addressed populations within fine-scales or few kilometers apart. In large geographic scales, the genetic differentiation among *P. cuvieri* populations was frequently high. In the present study, the ten

polymorphic microsatellite loci showed genetic structuring in *P. cuvieri* natural populations, which are from regions of Brazil apart from each other in a distance range of 99.41 Km (F_{ST} =0.615) to 2.936 Km (with F_{ST} =0.552). The data presented herein contribute to the knowledge on *P. cuvieri* genetic diversity and are potentially useful for monitoring natural populations of this species, as well as for future ecological and conservation guidelines for those living in degraded and fragmented areas.

Acknowledgements

The authors are thankful to Carmen S. Busin, Sérgio Siqueira Júnior, Maria Lúcia Del Grande, Denise C. Rossa-Feres and Gilda V. Andrade for providing frog specimens. A.P.S. and S.M.R.P. are research fellowship holders of the Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and M.C. is a graduate scholarship holder of the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). This project was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - grant 06/59697-7, awarded to SMRP).

References

- Allentoft ME, Siegismund HR, Briggs L, Andersen LW (2008) Microsatellite analysis of the natterjack toad (*Bufo calamita*) in Denmark: populations are island in a fragmented landscape. Conserv Genet 10 (1): 15-28
- Arens P, Bugter R, Westende W, Zollinger R, Stronks J, Vos CC, Smulders MJM (2006) Microsatellite variation and population structure of a recovering tree frog (*Hyla arborea* L.) metapopulation. Conserv Genet 7: 825-834
- Arens P, van der Slui T, van't Westende WPC, Vosman B, Vos CC, Smulders MJM (2007) Genetic population differentiation and connectivity among fragmented Moor frog (*Rana arvalis*) populations in The Netherlands. Landscape Ecol 22: 1489-1500
- Avise JC (2004) Molecular markers, natural history, and evolution. 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA
- Barber PH (1999) Patterns of gene flow and population genetic structure in the canyon treefrog *Hyla arenicolor* (Cope). Mol Ecol 8: 563-576
- Barreto LN, Andrade GV (1995) Aspects of the reproductive biology of *Physalaemus* cuvieri (Anura: Leptodactylidae) in northeastern Brazil. Amphibia-Reptilia, 16:67-76
- Barrio A (1965) El gênero *Physalaemus* (Anura, Leptodactylidae) en la Argentina. Physis 25: 421-448
- Berven KA, Grudzien TA (1990) Dispersal in the Wood Frog (*Rana sylvatica*): Implications for genetic population structure. Evolution 44: 2047-2056
- Burns EL, Eldridge DB, Houldens BA (2004) Microsatellite variation and population structure in a declining Australian Hylid *Litoria aurea*. Mol Ecol 13: 1745-1757

- Conte M, Cançado LJ, Laborda PR, Zucchi MI, Andrade GV, Rossa-Feres DC, Siqueira S, Souza AP, Recco-Pimentel SM (2009) Isolation and characterization of polymorphic microsatellites for the natural populations of barker frog *Physalaemus cuvieri*. Conserv Genet (DOI: 10.1007/s10592-009-9832-1)
- Creste S, Tulmann Neto A, Figueira A (2001) Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. Plant Mol Biol Rep 19: 299-306
- Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottleneck from allele frequency data. Genetics 144: 2001-2014
- Driscoll DA (1998a) Genetic structure, metapopulation processes and evolution influence the conservation strategies for two endangered frog species. Biol Conserv 83: 43-54
- Driscoll DA (1998b) Genetic structure of the frog *Geocrinia lutea* and *Geocrinia rosea* reflects extreme population divergence and range changes, not dispersal barriers. Evolution 52: 1147-1157
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Mol Ecol 14: 2611-2620
- Ficetola GF, De Bernardi F (2004) Amphibians in a human-dominated landscape: the community structure is related to habitat features and isolation. Biol Conserv 119: 219-230
- Frost DR (2009) Amphibians species of the world: an online reference, V5.3 Available at http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/American Museum of Natural History, New York, USA. Accessed 09 Mar 2009

- Funk WC, Blouin MS, Corn PS, Maxell BA, Pilliod DS, Amish S, Allendorf FW (2005) Population structure of Columbia spotted frogs (*Rana luteiventris*) is strongly affected by the landscape. Mol Ecol 14: 483-496
- Global Amphibian Assessment (2009) IUCN / Species Survival Comission / CI / CABS
 / Nature Service, Electronic Database accessible at: http://www.globalamphibians.org. Accessed 26 Mar 2009
- Goudet J (1995) Fst at version 1.2: a computer program to calculate F statistics. J Hered 86(6): 485-486
- Grant T, Frost DR, Caldwell JP, Gagliardo R, Haddad CFB, Kok PJR, Means DB, Noonan BP, Schargel WE, Wheeler WC (2006) Phylogenetic systematic of dart poison frogs and their relatives (Amphibia: Athesphatanura: Dendrobatidae). Bull Am Mus Nat Hist 299: 1-262
- Johansson M, Primmer CR, Merilä J (2007) Does habitat fragmentation reduce fitness and adaptability? A case study of the common frog (*Rana temporaria*). Mol Ecol 16: 2693-2700
- Kraaijeveld-Smit FJL, Beebee TJC, Griffiths RA, Moore RD, Schley L (2005) Low gene flow but high genetic diversity in the threatened Mallorcan midwife toad *Alytes muletensis*. Mol Ecol 14: 3307-3315
- Lewis PO, Zaykin D (2000) Genetic data analysis: computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d15). Free program distributed by authors over the Internet from the GDA, available in http://alleyn.eeb.uconn.edu/gda/ 2000
- Luikart G, Sherwin WB, Steele BM, Allendorf FW (1998) Usefulness of molecular markers for detecting population bottleneck via monitoring genetic change. Mol Ecol 7: 963-974

- Manier MK, Arnold SJ (2006) Ecological correlates of population genetic structure: a comparative approach using a vertebrate metacommunity. Proc R Soc B: Biol Sci 273: 3001-3009
- Martins VG, Bacci-Jr M (2001) Métodos moleculares para o estudo do DNA I Extração e Amplificação de DNA. Protocolos. Centro de Estudos de Insetos Sociais, UNESP/Rio Claro
- Nascimento LB, Caramaschi U, Cruz CAG (2005) Taxonomic review of the species groups of the genus *Physalaemus* Fitzinger, 1826 with revalidation of the genera *Engystomops* Jiménez-de-La-Espada, 1872 and *Eupemphix* Steindachner, 1863 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). Arq Mus Nac Rio de Janeiro 63:297-320
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 89:538-590
- Newman R, Squire T (2001) Microsatellite variation and fine-scale population structure in the wood frog (*Rana sylvatica*). Mol Ecol 10: 1087-1100
- Pritchard J K, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics, 155:945-959
- Quinderé YRSD, Tomatis C, Baldo D, Lourenço LB, Andrade GV, Recco-Pimentel SM (2009) Polytypic and polymorphic cytogenetic variations in the widespread anuran *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leiuperidae) with emphasis on nucleolar organizing regions. Biol Res 42: 79-92.
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. J Hered 86: 248-249

- Rowe G, Beebee TJC, Burke T (2000) A microsatellite analysis of natterjack toad, *Bufo calamita*, metapopulations. Oikos 88: 641-651
- Schmeller DS, Merilä J (2007) Demographic and genetic estimates of effective population and breeding size in the amphibian *Rana temporaria*. Conservation Biology 21(1): 142-151
- Seppä P, Laurila 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 canorus* (Anura, Bufonidae) based on single-strand conformation polymorphism analysis (SSCP) and mitochondrial DNA sequence data. Mol Ecol 9: 245-257
- Silva APZ, Haddad CFB, Kasahara S (1999) Nucleolus organizer regions in *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae), with evidence of a unique case of Ag-NOR variability. Hereditas 131:135-141
- Silva DM, Cruz AD, Bastos RP, Reis RL, Telles MPC, Diniz-Filho JAF (2007) Population structure of *Eupemphix nattereri* (Amphibia, Anura, Leiuperidae) from Central Brazil. Genet Mol Biol 30(4): 1161-1168
- Telles MPC (2005) Estrutura genética populacional de *Physalaemus cuvieri* Fitzinger
 1826 (anura: Leptodactylidae) e padrões de ocupação humana no estado de Goiás.
 Doctor Thesis (Ciências Ambientais), Universidade Federal de Goiás. 135pp.
- Telles MPC, Bastos RP, Soares TN, Resende LV, Diniz-Filho JAF (2006) RAPD variation and population genetic structure of *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leptodactylidae) in Central Brazil. Genetica 128: 323-332

Williamson-Natesan EG (2005) Comparison of methods for detecting bottlenecks from microsatellite loci. Cons Genet 6: 551-562

Wright S (1951) The genetical structure of populations. Ann. Eugenics 15: 321-354

Table 1 *P. cuvieri* populations, sampling localities in Brazil (States) and voucher specimen identification. MA = Maranhão; TO= Tocantins; MG = Minas Gerais; SP = São Paulo; MT = Mato Grosso; BA = Bahia; RS = Rio Grande do Sul. ZUEC= Museu de Zoologia "Prof. Dr. Adão José Cardoso", State University of Campinas, SP, Brazil; MNRJ=Museu Nacional do Rio de Janeiro, Federal University of Rio de Janeiro, SP, Brazil; BC= Laboratory register number in the Department of Anatomy, Cell Biology and Physiology, State University of Campinas, SP, Brazil.

Population	Region	Sampling Locality	Sample	Latitude/Long	Voucher accession
			size	itude	number (ZUEC)
MA1	Northeast	São Pedro da Água	13	5⁰00'02.85"'S,	MNRJ 2425,
		Branca MA		48º17'26.97'W	24256, 24259, 24261,
					24266, BC 92.13 to 92.20
MA2	Northeast	Urbano Santos, MA	15	3⁰12'30.07"'S,	ZUEC 13091, 13095,
				43º24'16.27'W	13097, 13098, 13102,
					13104,1315,
					13106, 13107, 13108,
					13110, 13111, 13124,
700				100 10107 0010	13126, 13127
103	North	Porto Nacional, TO	21	10º42′27.90′S,	ZUEC 13374, 13376 to
				48º25'01.35'W	13379, 13355 to 13359,
MC4	Southoost	Liberlândie MC	16	10054'20 00'0	14/02
IVIG4	Southeast	Obertandia, MG	10	10-04 09.99 0,	20EC 13300 10 13372, 14705 to 14712
SD5	Southoast	Vitária Pracil SP	1/	40°20 20.70 W	711EC 14667 to 14690
555	Southeast	Vitoria Drasii, SF	14	20°1149.033, 50≌29'22 82'\M	2020 14007 10 14000
SP6	Southoast	Palestina SP	17	2023'20 60'S	7UEC 14634 to 14642
510	Southeast	r alestina, Si	17	20 25 29.09 0, 49º25'5806"\W	14730 to 14732 14643 to
				45 25 5000 🗤	14647
SP7	Southeast	Nova Itapirema, SP	12	21º06'00 12'S	ZUEC 12355 to 12357
	Council			49º31'59.92'W	14681 to 14689
MT8	Middle	Chapada dos	17	15º27'10.24'S.	ZUEC 14616, 14617,
				55º44'20.94'W	14619 to 14633
	West	Guimaraes, MI			
BA9	Northeast	Vitória da Conquista, BA	16	14⁰51'53.12'S,	ZUEC 14714 to 14729
		• •		40º50'05.82'W	
RS10	South	Passo Fundo, RS	19	28º13'35.90"S,	ZUEC 14648 to 14666
				52º28'42.71"W	

Population	Ho	H _E	f	Allelic richness
MA1	0.803	0.481	-0.720	2.263
MA2	0.569	0.435	-0.322	2.707
TO3	0.417	0.571	0.273	3.543
MG4	0.505	0.484	-0.046	2.974
SP5	0.508	0.543	0.064	2.920
SP6	0.502	0.420	-0.200	2.583
SP7	0.616	0.402	-0.571	2.070
MT8	0.441	0.480	0.080	2.905
BA9	0.462	0.512	0.100	2.960
RS10	0.634	0.597	-0.063	3.327

Table 2 Means of observed (H_0) and expected (H_E) heterozygosities, breeding index(f) and allelic richness in P. cuvieri populations.

Populations	MA1	MA2	TO3	MG4	SP5	SP6	SP7	MT8	BA9	RS10
MA1	0	0.618	1.332	0.649	0.556	0.464	0.46	0.615	0.70	0.726
MA2	0.288	0	0.809	0.523	0.464	0.334	0.367	0.47	0.586	0.63
TO3	0.158	0.236	0	1.04	0.85	0.66	0.88	1.92	3.03	0.912
MG4	0.278	0.323	0.193	0	1.04	0.80	0.39	0.50	0.63	0.75
SP5	0.310	0.350	0.227	0.193	0	2.78	0.56	0.58	0.62	0.91
SP6	0.350	0.428	0.273	0.238	0.080	0	0.38	0.36	0.43	0.52
SP7	0.352	0.405	0.220	0.386	0.308	0.392	0	1.49	0.79	0.52
MT8	0.289	0.347	0.115	0.329	0.298	0.405	0.143	0	2.46	0.71
BA9	0.263	0.299	0.076	0.284	0.287	0.366	0.239	0.092	0	0.80
RS10	0.256	0.283	0.215	0.248	0.214	0.322	0.323	0.258	0.237	0

Table 3 Genetic differentiation measured by pairwise F_{ST} -values (lower triangle) and gene flow (*Nm*) values (upper triangle) of ten *P. cuvieri* populations.

		Inferred cl	usters								
Populations	Ne	А	В	С	D	E	F	G	Н		P<0.90
MA1	13	9 /0.863	0.007	0.023	0.048	0.013	0.021	0.008	0.007	0.010	4
MA2	15	0.022	0.005	0.016	0.017	0.007	0.007	10 /0.916	0.005	0.006	5
ТО3	21	0.054	0.056	1 /0.249	0.010	0.041	3 /0.454	0.111	0.008	0.018	17
MG4	16	0.014	0.108	9 /0.767	0.012	0.011	0.027	0.006	0.051	0.005	7
SP5	14	0.006	6 /0.551	0.009	0.005	0.008	0.010	0.035	2 /0.351	0.026	6
SP6	17	0.024	12 /0.863	0.006	0.007	0.013	0.006	0.007	0.027	0.046	5
SP7	12	0.005	0.006	0.004	0.003	0.006	0.006	0.004	0.005	12 /0.961	-
MT8	17	0.022	0.005	0.009	0.011	1 /0.468	0.085	0.009	0.060	2 /0.329	14
BA9	16	0.009	0.031	0.017	0.010	6 /0.485	3 /0.374	0.012	0.007	0.056	7
RS10	19	0.008	0.008	0.008	10 /0.596	0.007	0.008	0.018	5 /0.334	0.013	4

Table 4 Results of clustering analysis (STRUCTURE) for K=9 (mean probabilities for each population) Numbers in bold refer to the number of individuals assigned to one of the 9 clusters with probability \geq 0.90. The last column refers to individuals below this assignment. *Ne* is sample size

	MA1	MA2	TO3	MG4	SP5	SP6	SP7	MT8	BA9	RS10
MA1	0	0.3992	0.2533	0.4410	0.6193	0.5538	0.5201	0.4668	0.4397	0.5171
MA2	587.19	0	0.3936	0.5181	0.7095	0.8065	0.6528	0.6054	0.4977	0.5528
ТОЗ	673.75	992.89	0	0.3392	0.5031	0.4862	0.3308	0.1807	0.1275	0.5104
MG4	1564.29	1808.12	903.44	0	0.3115	0.3053	0.6961	0.6238	0.5237	0.5055
SP5	1769.00	2028.26	1052.03	289.21	0	0.0922	0.5080	0.6114	0.6319	0.4605
SP6	1746.03	2080.34	1045.33	203.19	109.40	0	0.6150	0.8483	0.7151	0.6612
SP7	1798.00	2098.46	1357.76	288.39	135.42	99.41	0	0.1492	0.3176	0.6677
MT8	1422.00	1899.97	942.42	874.35	766.32	861.79	904.81	0	0.1249	0.5395
BA9	1399.00	1316.18	928.77	906.29	1188.18	1103.55	1163.67	1560.70	0	0.5128
RS10	2631.85	2936.75	1956.25	1033.52	905.08	943.96	878.43	1437.55	1931.00	0

Table 5 Nei's genetic distance (1978) among ten P. cuvieri populations (upper triangle) and geographic distances among these populations (lower triangle)

Figure Captions

Fig. 1 Map of Brazil displaying the ten locations in which *P. cuvieri* natural populations were surveyed. MA1 = São Pedro da Água Branca, MA; MA2 = Urbano Santos, MA; TO3 = Porto Nacional, TO; MG4 = Uberlândia, MG; SP5 = Vitória Brasil, SP; SP6 = Palestina, SP; SP7 = Nova Itapirema, SP; MT8 = Chapada dos Guimarães, MT; BA9 = Vitória da Conquista, BA; RS10 = Passo Fundo, RS.

Fig. 2 Graphical output from the STRUCTURE software for K=9. Each vertical line represents a *P. cuvieri* specimen and the color composition displays the probability of the specimen to belong to each of the 9 clusters defined by this program.

Fig. 3 Isolation by distance among 10 P. cuvieri populations.

Figure 1











4.3. Artigo 3

Study of cryptic species within the *Physalaemus cuvieri* group (Anura): contribution from microsatellites markers

Mônica Conte^{*+} Maria I. Zucchi[#], Gilda V. Andrade[¥], Anete P. Souza⁺, Shirlei M. Recco-Pimentel^{*}

^{*}Departamento de Anatomia, Biologia Celular e Fisiologia, Instituto de Biologia (IB), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-970 Campinas, SP, Brazil

[#]Centro de Recursos Genéticos, Instituto Agronômico de Campinas (IAC), 13012-970 Campinas, SP, Brazil

[¥]Departamento de Biologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão (UFMA), 65080-040 São Luís, MA, Brazil

⁺Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia (IB), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-970 Campinas, SP, Brazil

Correspondence: Shirlei M. Recco-Pimentel; Fax: +55 19 35216185; e-mail: shirlei@unicamp.br

Abstract

The genetic structure of natural populations of *Physalaemus ephippifer* and *P. albonotatus* species was investigated and analyzed together with five previously studied populations of *P. cuvieri*. Nine *P. cuvieri* microsatellite loci were used in the analyses. The overall G_{ST} value (0.46) revealed high genetic variation among populations, as expected for different species. The Bayesian approach implemented by the STRUCTURE software clustered the seven populations in seven groups (K=7). All the *P. albonotatus* and *P. ephippifer* specimens were grouped in a single cluster each showing a clear differentiation with respect to *P. cuvieri*. The different behavior of some *P. cuvieri* individuals from Porto Nacional – TO and those of Passo Fundo – RS suggest they could be a new species and indicate the necessity of a taxonomic reevaluation. Despite the intrinsic difficulties in analyzing closely related species, the nine microsatellite loci were useful to study and delimitate these three species of the *P. cuvieri* group and their populations.

Keywords: Related species, frogs, microsatellites, Physalaemus, population structure.

Introduction

The *Physalaemus* anuran genus of the family Leiuperidae consists of 45 species (Frost 2009) distributed in seven groups: "albifrons", "cuvieri", "deimaticus", "gracilis", "henselii", "olfersii" and "signifer" (Nascimento et al. 2005). Of those 45 species, nine belong to the *P. cuvieri* group and are named *P. albonotatus*, *P. centralis*, *P. cicada*, *P. cuqui*, *P. cuvieri*, *P. ephippifer*, *P. erikae*, *P. fischeri* and *P. kroyeri*. The *P. cuvieri* group is widely distributed from southern to northern South America, in the east of Andes from Argentina to Venezuela, in the open Cerrado, Caatinga, Chaco and Llanos Domains (Nascimento et al. 2005).

The *P. cuvieri* group contains cryptic species with intraspecific morphological variation. Therefore, the identification of species, as *P. cuvieri*, *P. ephippifer P. albonotatus* (analyzed in this present work) and *P. centralis*, based exclusively on morphological characteristics is not reliable (Barrio et al. 1965). In addition, new species are supposed to occur and often their identification is difficult.

The correct species delimitation and identification is important for defining diversity and conservation strategies. The speciation process is not always accompanied by morphological changes, thus the true number of biological species is likely to be greater than currently known as most of the species are delineated on purely morphological traits (Bickford et al. 2006). Given the increasing worldwide destruction and disturbance of natural ecosystems, adding that most species remain not described, efforts to catalogue and explain biodiversity need to be prioritized.

DNA markers have been proven useful for detecting and differentiating morphologically similar species (Bickford et al. 2006), and have been used as molecular markers mainly to investigate the genetic structure of natural populations (Jones and Ardren 2003; Lai and Sun 2003). Microsatellites as genetic markers can be species-specific, but fortunately, the presence of highly conserved flanking regions has allowed crossamplifications in species that diverged as long as 470 million years ago (Zane et al. 2002). They can be used as heterologous molecular markers in closely related species. These markers offer great potential for studies on parentage (Myers and Zamudio 2004), gene flow (Austin et al. 2004; Kraaijeveld-Smit et al. 2005; Arens et al. 2007), and maintenance of genetic diversity (Funk et al. 2005; Wilkinson et al. 2007; Allentoft et al. 2008). High degrees of conservation in primer-binding sites have occasionally been shown among certain taxa (Hamill et al. 2007). Hence, microsatellites have been progressively accepted as genetic markers in analysis of populations, plant and animal species conservation and, they have been used to investigate population genetic structure in amphibians (Burns et al. 2004).

In this work, we report comparison among two species of the *P. cuvieri group* (*P. ephippifer* and *P. albonotatus*, one population each) along with five populations *P. cuvieri* using microsatellite markers, and like wise, to permit inferred analyses of population genetic structure from these closely related species of the *Physalaemus* genus.
Material and methods

Populations sampling and DNA extraction

The specimens analyzed in this work were sampled in seven localities of Brazil (Figure 1). In total, 111 individuals were collected in breeding season under a permit issued by the Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, Proc. 02010.002895/03-84). One population of each species, P. ephippifer (PA12) and *P. albonotatus* (MT13) (Table 1) were analyzed together with five populations of P. cuvieri from Urbano Santos - Maranhão state (MA2), Porto Nacional - Tocantins state (TO3), Uberlândia – Minas Gerais state (MG4), Passo Fundo – Rio Grande do Sul state (RS10) and Crateús – Ceará state (CE11). The populations MA2, TO3 and MG4 were previously analyzed by Conte et al. (2009) and also, these three populations plus CE11 (P.cuvieri), PA12 (P. ephippifer) and MT13 (P. albonotatus) were cytogenetically studied by Quinderé et al. (2009). In special, TO3 showed several remarkable chromosomal differences among *P. cuvieri* populations. To complete the sampling in this work, we added the RS10 population (analyzed by Conte et al. 2009, unpublished data). These authors showed that TO3 and RS10 populations were divided in two sets of individuals each, representing different sampled season. The accession numbers of voucher specimens are shown in Table 1.

Genomic DNA was extracted from liver, muscle and heart tissues of the *Physalaemus* specimens using the Genomic Prep Cells and Tissues DNA Isolation Kit (Amersham Pharmacia Biotech), and the TNES method (Tris, NaCl, EDTA, SDS) adapted by Martins and Bacci 2001.

Microsatellite analysis

Nine specific microsatellite loci, previously developed for *P. cuvieri* and named P1A10, P3A12, P6A8, P9C1, P12D1, P13A5, P17B10, P20D4 and P21D10 (Conte et al. 2009), were used to genotype the individuals in the present work. The choice of the nine microsatellite markers used was based on data from previous analyses regarding number of alleles, null alleles, observed and expected heterozygosities, and deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium (Conte et al. 2009).

PCR amplifications were performed according with Conte et al. (2009). PCR products were visualized on 3% agarose gel. Amplified DNA fragments were separated by electrophoresis on 6% denatured polyacrylamide gel using 10 pb ladder (Invitrogen) as size standard, and silver stained according to Creste et al. (2001).

Data analysis

The FSTAT software (Goudet, 1995) was used to estimate overall G_{ST} , G_{ST} pairwise (Nei 1973) and Cockerham's estimator of F_{IS} (*f* - inbreeding coefficient) in order to investigate possible deviations from the Hardy-Weinberg equilibrium. Means of expected and observed heterozygosities and Nei's genetic distances (Nei 1978) were calculated using GDA (Lewis and Zakin 2000).

The Bayesian approach has been extensively used in populations analyses. In the STRUCTURE software (Pritchard et al. 2000), K populations were assumed and each population is characterized by allelic frequency group in each loci. This software is able to cluster the individuals in populations that are as close as possible of the Hardy-Weinberg

equilibrium, without *a priori* information about sampling sites. This feature is important to recognize cryptic species (Falush et al. 2007). The STRUCTURE software was used to group the individuals in clusters. The analysis uses Bayesian model-based clustering algorithm and attempts to identify genetically distinct populations on the basis of patterns of allele frequencies. The allele frequencies correlated among populations were used and the STRUCTURE was applied in overlapping subsets of seven populations at a time. Runs were performed with a burn-in length of 100,000 and MCMC repeats of 100.000, with 10 iterations for each K. The range of possible Ks was from 2 to 7. Identification of number of distinct clusters (K) was performed following the procedure described by Evanno et al. (2005). In order to define the genetic relationships among populations, the neighbor-joining analysis (Saitou and Nei (1987) was performed using the DARwin 5.0 software (Perrier and Jacquemoud-Collet 2006).

Results

Of ten microsatellite loci previously developed for *P. cuvieri* (Conte at al. 2009), nine cross-amplified and were suitable for assessing genetic variability and genetic structure among the analyzed populations of *P. cuvieri*, *P. albonotatus* and *P. ephippifer*.

The overall H_E mean per population ranged from 0.09 in MT13 (*P. albonotatus*) to 0.58 in RS10 (*P. cuvieri*) populations. The H_o varied in a range of 0.15 in MT13 and 0.59 in RS10 (*P. cuvieri*), as shown in Table 2. The inbreeding coefficient (*f*) measures the correlation of genes among individuals belonging to a same population and it verifies random mating within the samples. The overall *f*-value was -0.12 (95% C.I.). The

predominance of negative *f*-values, calculated by each population (Table 2) suggests this was largely due to heterozygote excess.

The clustering analysis using STRUCTURE revealed K=7, indicating that the dataset contained 7 distinct genetic units (Figure 2). The population clustering probabilities (p>0.90) are listed in Table 3 and letters A to G symbolize the clusters. The close related species *P. ephippifer* (PA12) and *P. albonotatus* (MT13) were assigned in a single cluster each, cluster A and G, respectively (Table 3). The *P. cuvieri* populations grouping was: MA2 had 11 of 15 individuals assigned with all 14 individuals from CE11 in the cluster C; TO3 was divided in two sets, with 9 individuals assigned in the cluster E and 6 in the cluster F together with 11 individuals from MG4. Moreover, RS10 had two distinct sets: cluster B with 10 individuals and cluster D with 6 individuals. The clustering of the 7 *Physalaemus* populations is represented in Figure 2, in which the groups are distinguished by colors.

The overall G_{ST} value of 0.46 (95% C.I.) indicated a high genetic differentiation among sampled populations and in the G_{ST} pairwise, the values ranged from 0.17 between TO3 and PA12, to 0.77, between PA12 and MT13 (Table 4).

The Neighbor-Joining tree (10,000 bootstrap) generated by the DARwin software (Figure 3) revealed that the clustering was similar to the STRUCTURE (Figure 2). The first clade in the Figure 3 representation contained individuals from the populations PA12 (*P. ephippifer*). The next clade has part of TO3 individuals, followed by a set of individuals from RS10. The most apart clade has individuals from MT13. Subsequently, there is a clade consisted of a set of individuals from the RS10 population and lower there is other

branch composed of MA2 and CE11 individuals. Ultimately, the lowest positioned clade shows individuals from MG4 population and part of TO3.

Discussion

The results described herein demonstrated that the nine microsatellite loci described by Conte at al. (2009) are suitable to separate the closely related species studied in this analysis, besides, these markers were useful to accesses the genetic structure of these closely related *Physalaemus* species. Besides, these markers allowed to discriminate two populations (TO3 and RS10) of *P. cuvieri*.

The negative *f*-values found in six populations suggested an excess of heterozygote within these populations, probably due favorable heterozygote selection or an effect of sampling. Still, this negative values show that these populations are panmictic. Some authors found similar results for this coefficient (*i.e.* Schmeller and Merilä 2007; Allentoft et al. 2008).

In accordance to our expectative, the overall G_{ST} value (0.46) was high and indicated high genetic differentiation among populations. A smaller F_{ST} value (0.27) was recently estimated for ten *P. cuvieri* populations (Conte et al. unpublished data). This F_{ST} =0.27 in *P. cuvieri* is coherent when compared with the G_{ST} =0.46 reported in the present work for distinct yet closely related species analyzed together. In a previous study, Chiari et al. (2006) reported microsatellite and cytocrome *b* analyses of *Dyscophus antongilii* and *Dyscophus guineti*, in which the values of F_{ST} and R_{ST} were 0.606 and 0.546, respectively. These results suggested a clear genetic differentiation between the two *Dyscophus* species. Morgan et al. (2008), using microsatellite and DNA mitochondrial data, analyzed two species of frogs, *Pseudophryne pengilleyi* and *P. corroboree*, from distinct localities. The authors reported F_{ST} values more significant between geographically more distant populations, and the global Φ_{ST} showed that 18.7% of the molecular variation was partitioned among these populations. The present data of *Physalaemus* reflect a strong genetic differentiation among the sampling localities, showing that the microsatellites clearly distinguished the species involved in the present analysis.

The cytogenetic analysis of populations analyzed here (MA2, TO3, MG4 and CE11 - *P. cuvieri*, PA12 - *P. ephippifer* and MT13 - *P. albonotatus*) found a NOR (Nucleolar Organizer Region) pattern that allowed the clustering of the populations from MA2, CE11 and MG4, but the TO3 did not group with any other population. The PA12 NOR was located in the same chromosome of these four *P. cuvieri* populations, but in a distinct region of pair 8. *Physalaemus ephippifer* (PA12) differed also by the presence of heteromorphic ZZ/ZW sex chromosomes. Ultimately, the *P. albonotatus* (MT13) karyotype clearly distinguished this species from other species of the *P. cuvieri* group. For the RS10 population there are not any cytogenetic data.

The neighbor-joining tree obtained from the analysis with the DARwin software, similar to the clustering obtained by the STRUCTURE, were also useful to discriminate species of the *cuvieri* group. In the present work, these analysis discriminated PA12 and MT13 from each other and from other *P. cuvieri* populations analyzed. Even though they have been considered sibling species (Frost 2009), they were clearly separated in all the genetic analyses, including the STRUCTURE.

These two analyses clearly also separated the TO3 and RS10 (both *P. cuvieri*) populations in two groups each. Interesting, even though all TO3 specimens were collected

in the same locality, ten individuals were captured from February to April 2004, in an open pasture area, and 11 were sampled in a forest, in April 2007. The former sample of TO3 population clustered with MG4, suggesting that set of individuals could really be P. cuvieri, since MG4 behavior similarly to other populations of this species studied by Conte et al (in preparation). The second part did not show any grouping with the populations here analyzed, suggesting that these individuals probably belong to other species. Similar results were found for RS10 population. Seven individuals were sampled in 2006 and twelve specimens were collected in 2007. These specimens were also divided in two sets of individuals by Bayesian analysis, and none of these sets have shown any group with the Physalaemus species and populations analyzed here. The previous cytogenetic data (Quinderé et al., 2009) and the microsatellite analysis of the TO3 population (Porto Nacional county, TO) indicate that these individuals may probably belong to other species, although the individuals are morphologically identical to and identified as P. cuvieri. We suggest a taxonomic review of this population, as well as the individuals from RS10 population. These results reinforce that microsatellite analysis can be useful to detect problems in the species delimitation.

One crucial point in delimiting cryptic species is to distinguish between broad admixture and narrow contact zone or yet a restrict hybridization (Fouquet et al. 2007). There are several but perhaps incorrect assumptions about cryptic species, indicating that their speciation was so recent that morphological or other diagnosable trait have not yet evolved. Strong divergent natural or sexual selections are thought to be primary drivers behind rapid morphological divergence with little accompanying genetic differentiation (Bickford et al. 2006). Then, it is difficult to explain or identify the mechanisms involved in the cryptic species differentiation. There are few studies on population genetic structure of related species (Rosenberg et al. 2001; Parker et al. 2004; Engel et al. 2005; Ellis et al. 2006; Chiari et al. 2006), but they are rare for anuran sibling species.

The difficult of morphological distinction among individuals from *P. cuvieri* demonstrates that closely related species may persist undetected in suitable habitats for decades or longer, even when those areas have been extensively studied. According to Luhring (2008), management decisions dependent on the perceived absence of a cryptic species should be made with the utmost caution, a high volume of targeted survey efforts and long-term data sets because hidden biodiversity can remain obscure to the most qualified of experts.

The results found here showed that microsatellites markers were useful to access the genetic structure of three related species from *Physalaemus* genus. The levels of interspecific variation detected among these species, make microsatellites markers suitable for studies of population differentiation of this anuran species. The separation occurred between TO3 and RS10 deserve a special attention and additional works should be done to better understanding these results.

Acknowledgements

The authors thank Stenio V. Vittorazzi, Sérgio Siqueira and Carmen S. Busin for providing frog specimens. This project received financial support from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - Grant 06/59697-7, awarded to SMRP) and from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - graduate scholarship awarded to MC and PROEX grant to BCE course).

References

- Allentoft ME, Siegismund HR, Briggs L, Andersen LW (2008) Microsatellite analysis of the natterjack toad (*Bufo calamita*) in Denmark: populations are island in a fragmented landscape. Conserv Genet 10: 15-28
- Arens P, van der Slui T, van't Westende WPC, Vosman B, Vos CC, Smulders MJM (2007)
 Genetic population differentiation and connectivity among fragmented Moor frog (*Rana arvalis*) populations in The Netherlands. Landscape Ecol 22: 1489-1500
- Austin JD, Lougheed SC and Boag PT (2004) Controlling for the effects of history and nonequilibrium conditions in gene flow estimates in northern bullfrog (*Rana catesbeiana*) populations. Genetics 168: 1491–1506
- Barrio A (1965) El gênero *Physalaemus* (Anura, Leptodactylidae) en la Argentina. Physis 25: 421-448
- Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, Ng PKL, Meier R, Winker Ingram KK, DAS I (2006) Cryptic species as a window on diversity and conservation. Trends Ecol Evol 22: 148-155
- Burns EL, Eldridge MDB, Houlden BA (2004) Microsatellite variation and population structure in a declining Australian Hylid *Litoria aurea*. Molecular Ecology 13: 1745-1757.
- Chiari Y, Orozco-TerWengel P, Vences M, Vieites DR, Sarovy A, Randrianirina JE, MeyerA, Louis Jr E (2006) Genetic identification of units for conservation in tomato frogs,genus Dyscophus. Conserv Genet 7: 473–482
- Conte M, Cançado LJ, Laborda PR, Zucchi MI, Andrade GV, Rossa-Feres DC, Siqueira S, Souza AP, Recco-Pimentel SM (2009) Isolation and characterization of polymorphic

microsatellites for the natural populations of barker frog *Physalaemus cuvieri*. Conserv Genet. DOI: 10.1007/s10592-009-9832-1

- Creste S, Tulmann Neto A, Figueira A (2001) Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. Plant Mol Biol Rep 19: 299-306
- Ellis JR, Pashley CH, Burke JM, McCauley DE (2006) High genetic diversity in rare and endangered sunflower as compared to a common congener. Mol Ecol 15: 2345-2355
- Engel CR, Daguin C, Serrão EA (2005) Genetic entities and mating system in hermaphroditic *Fucus spiralis* and its close dioecious relative *F. vesiculosus* (Fucaceae, Phaeophyceae). Mol Ecol 14: 2033-2046
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Mol Ecol 14: 2611-2620
- Falush D, Sthephens M, Pritchard JK (2007) Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. Mol Ecol Notes 7(4): 574-578
- Fouquet A, Vences M, Salducci MD, Meyer A, Marty C, Blanc M, Gilles A (2007) Revealing cryptic diversity using molecular phylogenetics and phylogeography in frog of *Scinax ruber* and *Rhinella margaritifera* species groups. Mol Phyl Evol 43: 567-582
- Frost DR (2009) Amphibians species of the world: an online reference, V5.3 Available at http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/American Museum of Natural History, New York, USA. Accessed 12 Apr 2009

- Funk WC, Blouin MS, Corn PS, Maxell BA, Pilliod DS, Amish S, Allendorf FW (2005)Population structure of Columbia spotted frogs (*Rana luteiventris*) is strongly affectedby the landscape. Mol. Ecol. 14: 483-496
- Goudet J (1995) Fst at version 1.2: a computer program to calculate F statistics. J Hered 86(6): 485-486
- Hamill RM, Webb SA, Maci AS, Garcia C, Graves JA, Magurran AE, Ritchie MG (2007) Comparison of genetic diversity at microsatellite loci in near-extinct and nonendangered species of Mexican goodeine fishes and prediction of cross-amplification within the family. J Fish Biol 70 (Supplement A): 16–32
- Jones AG, Ardren WR (2003) Methods of parentage analysis in natural populations. Mol Ecol 12: 2511-2523
- Kraaijeveld-Smit FJL, Beebee TJC, Griffiths RA, Moore RD, Schley L (2005) Low gene flow but high genetic diversity in the threatened Mallorcan midwife toad *Alytes muletensis*. Mol. Ecol. 14: 3307-3315
- Lai Y, Sun F (2003) The relationship between microsatellite slippage mutation rate and the number of repeat units. Mol Biol Evol 20: 2123–2131
- Lewis PO, Zaykin D (2000) Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d15) Free program distributed by authors over the Internet from the GDA, available in http://alleyn.eeb.uconn.edu/gda/ 2000
- Luhring TM (2008) "Problem Species" of the Savannah River Site, such as Brimley's Chorus Frog (*Pseudacris brimleyi*), demonstrate the hidden biodiversity concept on an intensively studied government reserve. Southeast Nat Notes 7: 371-373

- Martins VG, Bacci Jr M (2001) Métodos moleculares para o estudo do DNA I Extração e Amplificação de DNA. *Protocolos*. Centro de Estudos de Insetos Sociais. UNESP/Rio Claro
- Morgan MJ, Hunter D, Pietsch R, Osborne W, Keogh JS (2008) Assessment of genetic diversity in the critically endangered Australian corroboree frogs, *Pseudophryne corroboree* and *Pseudophryne pengilleyi*, identifies four evolutionarily significant units for conservation. Mol Ecol 17: 3448–3463
- Myers EM and Zamudio KR (2004) Multiple paternity in an aggregate breeding amphibian: the effect of reproductive skew on estimates of male reproductive success. Mol Ecol 13: 1951-1963
- Nascimento LB, Caramaschi U, Cruz CAG (2005) Taxonomic review of the species groups of the genus *Physalaemus* Fitzinger, 1826 with revalidation of the genera *Engystomops* Jiménez-de-La-Espada, 1872 and *Eupemphix* Steindachner, 1863 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). Arq Mus Nac Rio de Janeiro 63: 297-320
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc Natl Acad Sci USA 70: 3321-3323
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 89:538-590
- Parker HG, Kim LV, Sutter NB, Carlson S, Lorentzen TD, Malek TB, Johnson GS, DeFrance HB, Ostrander EA, Kruglyak L (2004) Genetic structure of purebred domestic dog. Science 304: 1160-1164

Perrier X, Jacquemoud-Collet JP (2006) DARwin software http://darwin.cirad.fr/darwin

- Pritchard J K, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155: 945-959
- Quinderé YRSD, Tomatis C, Baldo D, Lourenço LB, Andrade GV, Recco-Pimentel SM (2009) Polytypic and polymorphic cytogenetic variations in the widespread anuran *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leiuperidae) with emphasis on nucleolar organizing regions. Biol Res 42: 79-92.
- Rosenberg NA, BurkeT, EloK, Feldman MW, Freidlin PJ, Groenen MAM, Hillel J, Mäki-Tanila A, Tixier-Boichard M, Vignal A, Wimmers K, Weigend S (2001) Empirical evaluation of genetic clustering methods using multilocus genotypes from 20 chicken breeds. Genetics 159: 699–713
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol 4: 406-425
- Schmeller DS, Merilä J (2007) Demographic and genetic estimates of effective population and breeding size in the amphibian *Rana temporaria*. Conserv Biology 21: 142-15
- Wilkinson JW, Beebee TJC, Griffiths RA (2007) Conservation genetics of an island toad: Bufo bufo in Jersey. Herpet J 17: 192-198
- Zane L, Bargelloni L, Patarnello T (2002) Strategies for microsatellite isolation: a review. Mol Ecol 11: 1-16

Table 1 Sampling localities of *Physalaemus* populations and total number of analyzed specimens.**MNRJ** - National Museum of Rio de Janeiro;**ZUEC** -Zoology Museum of the State University of Campinas; and UFMT – Museum of the Federal University of Mato Grosso

	Population		Region of		No. of	
Species	symbol	Sampling localities	Brazil	Biome	Specimens	Museum accession number
	MA2	Urbano Santos, Maranhão (3º12'30.07''W; 43º24'16.27''S)	Northeast	Cerrado	15	ZUEC 13091; 13095; 13097; 13098; 13102;13104;1315; 13106; 13107; 13108; 13110; 13111; 13124; 13126 and 13127
	ТОЗ	Porto Nacional, Tocantins (10º42'27.90''W; 48º25'01.35''S)	North	Cerrado	21	ZUEC 13374; 13376 to 13379; 13355 a 13359; 14691 to 14697 and14699 to14702
P. cuvieri	Uberlândia, Minas Gera MG4 (18º54'39.99''W; 48º20'25.76''S)		Southeast	Cerrado	16	ZUEC 13366 to 13372; 14705 to 14713
	RS10	Passo Fundo, Rio Grande do Sul (28º13'35.90" W; 52º28'42.71" S)	South	Pampas	19	ZUEC 14648 to 14666
	CE11	Crateús, Ceará (5º11'49.02" W; 40º40'10.52" S)	Northeast	Caatinga	14	ZUEC 13077 to 13079; 13081 to 13083 and 13085 to 13090
P. ephippifer	PA12	Belém, Pará (1º27'14.24'' W; 48º30'28.99'' S)	North	Amazonia	15	ZUEC 13703 to 13705; 13708; 13709 and 13730 to 13739
P. albonotatus	MT13	Lambari d'Oeste, Mato Grosso (15° 50' 00" W; 57° 35' 00" S)	Middle-east	Pantanal/ Cerrado	11	UFMT 4462 to 4472

Table 2 *Physalaemus* populations analyzed with microsatellites. PA12 = *P. ephippifer*; MT13 = *P. albonotatus*; other five populations (MA2, TO3, MG4, RS10, CE11) = *P. cuvieri*; H_E = expected heterozygosity; H_O = observed heterozygosity; *f* = breeding index

Population	He	Но	f
MA2	0.41	0.56	-0.38
TO3	0.54	0.45	0.18
MG4	0.46	0.53	-0.14
RS10	0.58	0.59	-0.03
CE11	0.30	0.31	-0.05
PA12	0.34	0.47	-0.37
MT13	0.09	0.15	-0.61

Table 3 Results of STRUCTURE analysis for thirteen *Physalaemus* populations (K=7) showing mean probabilities for each population to belong a cluster. Numbers in bold refer to the individuals assigned to one of the 7 clusters, with probability >0.90. The last column at the right side refers to the remaining individuals assigned to other clusters. PA12 = *P. ephippifer*; MT13 = *P. albonotatus*; other five populations (MA2, TO3, MG4, RS10, CE11) = *P. cuvieri*. *Ne* is sample size

Inferred cluster by STRUCTURE									
Populations sampled	Ne	Α	В	С	D	E	F	G	P<0.90
MA2	15	0.006	0.023	11 /0.933	0.005	0.008	0.023	0.002	4
TO3	21	0.018	0.012	1 /0.1	0.009	9 /0.498	6 /0.361	0.002	5
MG4	16	0.005	0.011	0.007	0.059	0.016	11 /0.9	0.002	5
RS10	19	0.006	10 /0.599	0.026	6 /0.353	0.006	0.007	0.003	3
CE11	14	0.004	0.005	14 /0.964	0.004	0.013	0.006	0.004	-
PA12	15	13 /0.95	0.012	0.004	0.015	0.014	0.004	0.002	2
MT13	11	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	11 /0.989	-

	US2	TO3	MG4	RS10	CE11	PA12	MT13
US2	0						
TO3	0.24	0					
MG4	0.36	0.20	0				
RS10	0.31	0.23	0.28	0			
CE11	0.34	0.30	0.37	0.40	0		
PA12	0.45	0.17	0.44	0.35	0.54	0	
MT13	0.72	0.64	0.68	0.63	0.74	0.77	0

Table 4 Genetic differentiation among populations measured as pairwise G_{ST} values (lower)

Figure Captions

Figure 1 Map of Brazil displaying the sampling localities of *Physalaemus* populations. PA12 = *P. ephippifer*; MT13 = *P. albonotatus*; the five remaining populations = *P. cuvieri*.

Figure 2 Colours scheme: graphical output from STRUCTURE for K=7. Clustering of *Physalaemus* populations, with K=7. The color composition displays the probability of belonging to each of the seven clusters defined by STRUCTURE.

Figure 3 Neighbor-joining dendrogram. Numbers in the dendrogram indicate bootstrap probability (%) based on 100,000 replicates. Only probabilities over 50% were represented. Color representation of the five clusters and identification of specimens are as following: Red= PA12; Pink= part of TO3; Yellow= part of RS10; Orange= MT13; Green= remain of RS10; Dark Blue= CE11 and MA2; Pale Blue= remain of TO3.

Figure 1





Figure 2



5. CONCLUSÕES

O presente trabalho ampliou o conhecimento sobre a estruturação e variação genética entre e dentro de populações de *P. cuvieri* e de espécies do grupo de *P. cuvieri*, utilizando a análise de microssatélites. Os principais aspectos e as conclusões desse estudo foram:

- o isolamento e caracterização de 10 locos de microssatélites para estudo da estrutura genética de populações de *P. cuvieri*;

- a análise de 10 populações de *P. cuvieri* mostrou uma grande variabilidade genética entre essas populações;

- os dados apontaram para a baixa dispersão dos indivíduos de *P. cuvieri*, o que condiz com o comportamento filopátrico atribuído aos anuros, conforme já mostrado em diversos estudos envolvendo a investigação da estrutura genética de populações;

- a alta filopatria de *P. cuvieri* está de acordo com o valor de fluxo gênico encontrado neste trabalho – restrito e histórico - com menos de um migrante por geração, admitindo modelo de ilha; esse resultado pode ser devido a escala geográfica muito ampla utilizada neste trabalho;

- os dados que relacionam distância genética e distância geográfica, também mostraram alta fidelidade de *P. cuvieri* aos seus locais de desova, já que populações geograficamente próximas não se mostraram necessariamente mais semelhantes geneticamente do que com as distantes, ou seja, a distância geográfica sozinha não explica a variabilidade genética detectada entre essas populações;

- as dez populações amostradas agruparam em nove *clusters* distintos porque duas populações do estado de São Paulo (Vitória Brasil e Palestina) agruparam em um único

cluster, mostrando que essas duas populações têm grande similaridade nas frequências de seus alelos;

- parte dos indivíduos de Porto Nacional - TO (TO3) agrupou com indivíduos de Uberlândia (MG) e parte com Vitória da Conquista – BA (BA9). Porto Nacional e Vitória da Conquista apresentaram uma baixa distância genética e um alto valor de fluxo gênico, o que pode explicar tal agrupamento e sugerir que esses indivíduos possuem um pool gênico mais semelhante entre elas que entre as demais populações analisadas nesse estudo;

- duas populações, São Pedro da Água Branca – MA (MA1) e Nova Itapirema – SP (SP7), mostraram estar sob efeito de gargalo populacional (*bottleneck*), que pode ser resultado da destruição do hábitat e fragmentação da população, já que essas duas populações estão em áreas com diversos distúrbios como estradas e plantações. Como não se têm dados sobre o tamanho efetivo dessas populações no passado, não se pode afirmar que de fato tiveram redução em seus tamanhos populacionais. No entanto, a informação do gargalo populacional atual é importante para o desenvolvimento de estratégias de conservação, já que populações nessas condições sofrem com perda de sua variabilidade genética aumentando a chance de extinção;

- a análise Bayesiana permitiu discriminar dois conjuntos de indivíduos na população de Passo Fundo (RS10), oriundos de duas coletas efetuadas em anos distintos, e um desses conjuntos de indivíduos se diferenciaram das demais populações estudadas; o que pode ser explicado pelo aparecimento de prováveis alelos privados para dois locos nessa população, sugerindo que esses indivíduos de Passo Fundo possam pertencer a outra espécie;

populações de *P. cuvieri* de Urbano Santos – MA (MA2), Porto Nacional – TO (TO3)
e Uberlândia – MG (MG4), e de Crateús – CE (CE11), todas já analisadas
citogeneticamente, e ainda de Passo Fundo – RS (RS10) foram analisadas em conjunto
com duas espécies crípticas, *P. ephippifer* e *P. albonotatus*. Foram utilizados nove
marcadores microssatélites de *P. cuvieri*, os quais permitiram mostrar que *P. ephippifer*e *P. albonotatus* não agrupam com nenhuma outra população ou espécie indicando
claramente a condição de espécies distintas de *P. cuvieri*;

- os indivíduos de *P. cuvieri* de Crateús – CE (CE11),que inicialmente foram nominados *P.* cf. *cuvieri*, agruparam com indivíduos da população de Urbano Santos – MA (MA2),
corroborando os estudos citogenéticos que mostraram que se trata de uma população de *P. cuvieri*;

- a divisão obtida dentro da população de Porto Nacional (TO), pela análise Bayesiana, coincide com os dois grupos coletados em épocas (2004 e 2007) e habitat (pastagem e árvores) distintos na mesma região; o primeiro conjunto de indivíduos de Porto Nacional agrupou com *P. cuvieri* de Uberlândia – MG (MG4), indicando que os indivíduos dessa primeira coleta realmente sejam *P. cuvieri*. O segundo conjunto de indivíduos não mostrou agrupamento com nenhuma outra popualação, indicando que podem pertencer a outra espécie não analisada neste trabalho;

- os microssatélites previamente desenvolvidos para *P. cuvieri* permitiram acessar a estrutura genética de duas espécies proximamente relacionadas a *P. cuvieri*, *P. albonotatus* e *P. ephippifer*, e o nível de variação interespecífica, o que faz esse marcador ser útil para estudos de diferenciação genética dessas espécies. Esses marcadores mostraram uma separação clara de *P. cuvieri* em relação às demais espécies crípticas analisadas neste trabalho;

- os dados desse trabalho apontam para a necessidade de estudos adicionais com outros métodos de análise para investigar algumas populações atribuídas a *P. cuvieri*, como as de Tocantins e de Passo Fundo, que apresentaram indícios de que possam se tratar de outra espécie.

6. APÊNDICE

1. Gáfico gerado pelo programa STRUCTURE para run79 e K=9, para as 10 populações de *P. cuvieri*, mostrando a ordem original distribuído em múltiplas linhas. Cada barra se refere a um individuo analisado, e os números entre parênteses referem-se à população que esse indivíduo pertence.



2. Gáfico gerado pelo programa STRUCTURE para run 54 e K=7, para as 5 populações de *P. cuvieri*, mais uma de *P. ephippifer* e uma de *P. albonotatus*, mostrando a ordem original distribuído em múltiplas linhas. Cada barra se refere a um individuo analisado, e os números entre parênteses referem-se à população que esse indivíduo pertence.

