

EFICIÊNCIA DO GENE MITOCONDRIAL 16S rRNA NA IDENTIFICAÇÃO DE GIRINOS (AMPHIBIA: ANURA) DA CAATINGA ALAGOANA

Marcos Jorge Matias Dubeux (1,2); Ubiratan Gonçalves (2); Tamí Mott (1,2)

(1) *Universidade Federal de Alagoas*: marcosdubeux.bio@gmail.com; tamimott@hotmail.com

(2) *Museu de História Natural*: ugsbogertia@gmail.com

INTRODUÇÃO

Dentre as 7.546 espécies de anfíbios atuais alocadas em três ordens (Anura, Caudata e Gymnophiona), Anura inclui aproximadamente 96% desta diversidade (Frost, 2016). Os anuros apresentam geralmente duas fases distintas ao longo de seu desenvolvimento, uma larval aquática (girino) e uma adulta terrestre (sapo, rã ou perereca, Pough et al., 2008). Apesar dos girinos serem restritos a corpos d'água e relativamente abundantes onde ocorrem, 40% das espécies de anuros não tem seu girino conhecido (Rossa-Feres et al., 2015). Essa falta de conhecimento é preocupante, pois a pele permeável e nua dos anfíbios e a ocupação dos dois biótopos no seu ciclo de vida (água e terra) tornam estes animais muito vulneráveis a diversos fatores ambientais (Stuart et al., 2004; Wake e Vredenburg, 2008; Verdade et al., 2010; Verdade et al., 2012). De fato, os anfíbios representam o grupo taxonômico mais ameaçado de extinção (40% das espécies mundiais apresentam declínio populacional, IUCN, 2014), e o desmatamento tem sido o principal responsável pelo seu declínio (Wake e Vredenburg, 2008).

O Brasil lidera a diversidade mundial de anfíbios com 1.080 espécies descritas, 1.039 são anuros (SBH, 2016). Dentre os seis biomas brasileiros (IBGE, 2004), a maioria das pesquisas científicas têm sido realizadas nos biomas florestais (Mata Atlântica e Amazônia) ou nos *hotspots* mundiais (Mata Atlântica e Cerrado, Myers et al., 2000). A Caatinga, apesar de ser o único bioma exclusivamente brasileiro ainda não tem atraído tanta atenção e historicamente tem sido considerado um bioma com baixa riqueza e endemismo (Mares et al., 1985). Estudos recentes desafiaram esta afirmação e levantamentos faunísticos revelaram que na verdade há um grande déficit de conhecimento acerca da biodiversidade nesse bioma (Rodrigues, 2003; Albuquerque et al., 2012; Roberto et al., 2013; Pedrosa et al., 2014; Almeida et al., 2016).

No estado de Alagoas por exemplo, metade do seu território originalmente era Caatinga, e 64% dos municípios alagoanos situados na Caatinga não apresentam sequer um registro de anuro (Almeida et al., 2016). Apesar deste conhecimento incipiente sobre a anurofauna da Caatinga alagoana, 30 espécies de anuros (das 72 espécies já registradas para o Estado), já foram registradas, porém são escassos os estudos acerca da biologia desses animais, principalmente em relação a sua fase larval (Albuquerque et al., 2012).

O grande número de espécies crípticas somada a falta de características diagnósticas e a escassez de chaves de identificação de girinos dificultam a identificação utilizando apenas uma análise morfológica. Entretanto, uma abordagem molecular utilizando um fragmento do gene mitocondrial 16S rRNA (DNA *barcode*) vem auxiliando na identificação de girinos e já se mostrou eficaz em identificar anuros de Borneo, Madagascar, Espanha e Peru (Malkmus & Kosuch, 2000; Vences et al., 2005b; Thomas et al., 2005; Moravec et al., 2014). No Brasil, essa ferramenta foi testada apenas na Área de Proteção Ambiental Catolé e Fernão Velho, Alagoas (Correia et al., 2014). Desse modo,

o objetivo do presente estudo foi verificar a eficiência do gene mitocondrial 16S rRNA como ferramenta para auxiliar na identificação de girinos da Caatinga alagoana.

METODOLOGIA

Para a análise molecular foi utilizado tecido da musculatura caudal de girinos coletados na Caatinga e zonas de transição entre a Caatinga e a Mata Atlântica no estado de Alagoas já incorporados ao Banco de Tecido da Coleção de Anfíbios e Répteis do Museu de História Natural da Universidade Federal de Alagoas (MHN-UFAL). Onze amostras, representantes de nove morfotipos, tiveram o DNA genômico total extraído utilizando o método de extração com sais (Aljanabi e Martinez, 1997). Após, uma reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação de 560 pares de base (pb) do gene mitocondrial 16S rRNA foi realizada. A presença de *amplicons* foi verificada através de uma eletroforese em gel de agarose 1% corado com *Sybr safe* e visualizado no trasluminador com luz ultravioleta. As oito amostras funcionais foram purificadas com isopropanol e enviadas ao Laboratório Central do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (LabCen/UFPE) para serem sequenciadas unidirecionalmente utilizando o método de Sanger após a reação do Big Dye terminator. As sequências obtidas foram editadas e alinhadas no software BioEdit (Hall, 2011). Para realizar o alinhamento múltiplo, foram utilizadas 49 sequências representando 26 espécies que já foram registradas na Caatinga e em áreas de transição no estado de Alagoas e que se encontram disponíveis no GenBank. Foi gerado dois dendrogramas através do método Neighbour-Joining com o modelo de substituição nucleotídica Kimura-2-parâmetros (K2P). Estes agrupamentos foram testados pelo método de bootstrap com 1.000 pseudo-réplicas utilizando o software MEGA6 (Tamura et al., 2013).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 11 amostras representando os nove morfotipos incluídas neste projeto, oito amplificaram o fragmento de DNA almejado e foram sequenciadas e analisadas. Essas amostras foram identificadas morfológicamente como: Hylidae (*Dendropsophus minutus*: MUFAL12476, MUFAL12477, MUFAL12479; *Hypsiboas* sp.4: MUFAL12478; *Hypsiboas* sp.5: MUFAL12482; *Phyllomedusa nordestina*: MUFAL12483); Pipidae (*Pipa carvalhoi*: MUFAL12485) e Leptodactylidae (*Leptodactylus* sp.9: MUFAL12487).

Dois dendrogramas foram gerados, um apenas com as espécies pertencentes à família Hylidae (por representar mais da metade da diversidade do estado) e outro com as demais famílias (Figura 1 A e B).

Em Alagoas, o gênero *Hypsiboas* (Hylidae) é representado por oito espécies de anuros cujo girinos são morfológicamente semelhantes. A abordagem molecular possibilitou a identificação específica de dois espécimes morfológicamente identificados somente a nível genérico. MUFAL12482 = *Hypsiboas* sp.5 apresentou haplótipo idêntico com *Hypsiboas albomarginatus* de Pernambuco e MUFAL12478 = *Hypsiboas* sp.4 apresentou distância genética de 3,5% com *Hypsiboas faber* do Brasil. Os espécimes MUFAL12476, MUFAL12477 e MUFAL12479 foram identificados morfológicamente como *Dendropsophus minutus* e sua identificação morfológica foi corroborada com a molecular (apresentaram haplótipos idênticos e se agruparam com coespecíficos apresentando menor distância genética [1%] com um espécime do Maranhão e maior distância genética [3,5%] com um espécime da Bolívia). O espécime MUFAL12483 identificado

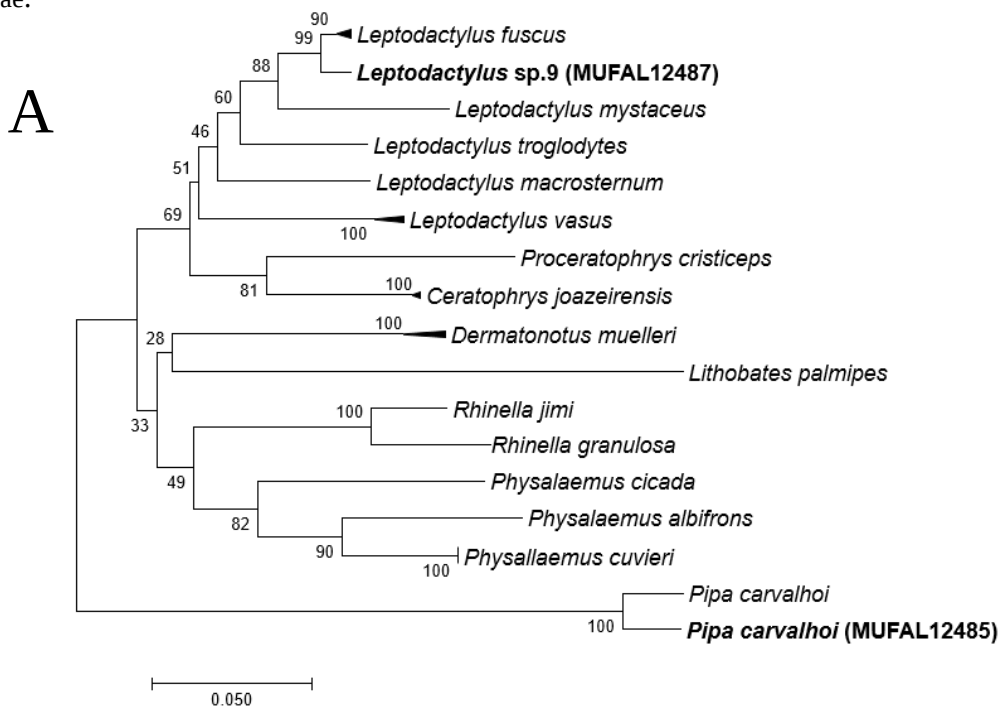
morfologicamente como *Phyllomedusa nordestina* se agrupou com sequências da mesma espécie da Bahia apresentando distância genética de 3,9%, corroborando sua identificação morfológica.

Para a família Leptodactylidae o espécime MUFAL12487 identificado morfológicamente somente a nível genérico (*Leptodactylus* sp.9) se agrupou com sequências de *Leptodactylus fuscus* (distância genética de 1,6% com o espécime de Pernambuco); desse modo, a abordagem molecular possibilitou a sua identificação a nível específico.

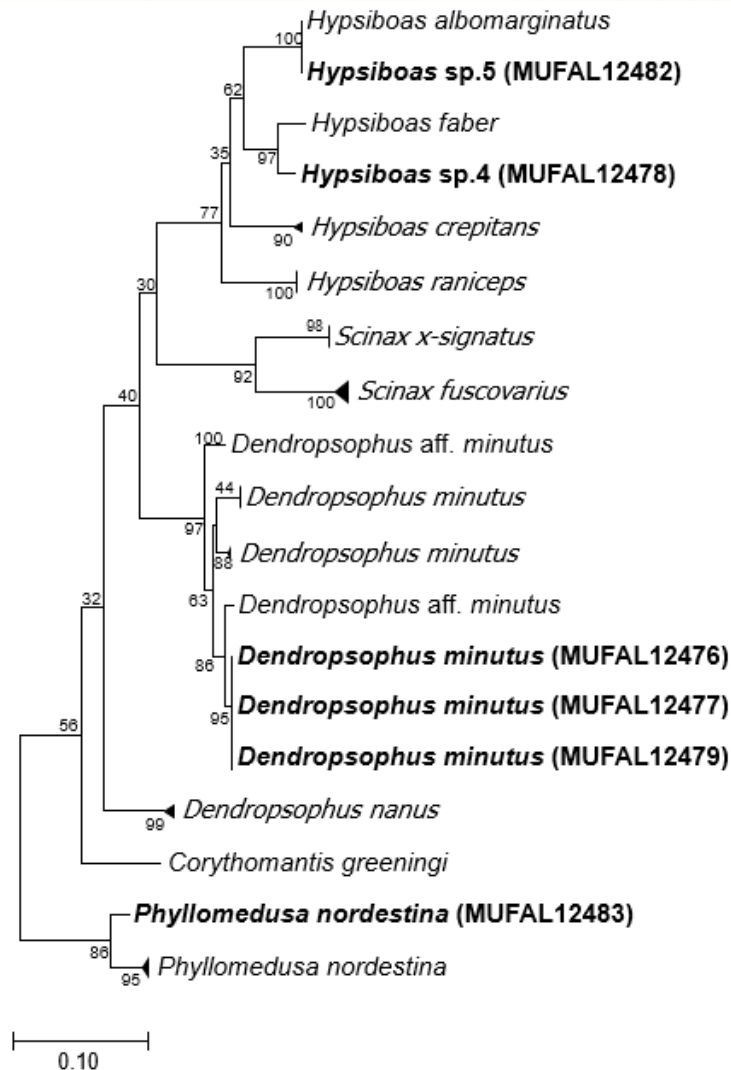
Para a família Pipidae, o espécime MUFAL12485 morfológicamente identificado como *Pipa carvalhoi* se agrupou com a sequência de seu coespecífico apresentando distância genética de 3,7% corroborando sua identificação morfológica.

O ponto de corte para identificar espécies através do DNAbarcode deve ser alto suficiente para acomodar a divergência intraespecífica e baixo o suficiente para conseguir diferenciar todas as espécies, inclusive as recém-emergentes (Fouquet et al., 2007). Para os anfíbios, três pontos de corte para divergência intraespecífica no gene 16S rRNA já foram sugeridos: 1% (Vences et al., 2005a), 5% (Vences et al., 2005b) e 3% (Fouquet et al., 2007; Vieites et al., 2009), porém ainda não há um consenso sobre qual ponto de corte é o mais adequado. Os três pontos de corte foram testados, entretanto o ponto de corte de 5% foi o mais adequado para as espécies de anuros da Caatinga alagoana. Possivelmente, este resultado justifica-se pois a maioria das espécies aqui analisadas apresenta distribuição geográfica ampla (por exemplo *Leptodactylus fuscus* e *Dendropsophus minutus* ocorrem em quase toda a extensão da América do Sul) e conseqüentemente uma maior variabilidade genética ao longo de sua distribuição é esperada.

Figura 1: Dendrograma gerado pelo método de Neighbor-Joining com o modelo evolutivo Kimura-2-parâmetros utilizando fragmentos de 560 pares de bases do gene mitocondrial 16SrRNA e testado pelo método de bootstrap com 1.000 pseudo-réplicas (valores acima dos ramos representam o suporte em porcentagem). As sequências de DNA obtidas neste projeto estão em negrito, as outras foram importadas do GenBank. (A) Espécies das famílias Bufonidae, Ceratophryidae, Leptodactylidae, Microhylidae, Odontophrynidae, Pipidae e Ranidae (B) Espécies da família Hylidae.



B



CONCLUSÃO

A abordagem molecular auxiliou na identificação específica de três espécimes (*Hypsiboas albomarginatus*, *Hypsiboas faber* e *Leptodactylus fuscus*) identificados morfológicamente apenas a nível genérico (*Hypsiboas sp.4*, *Hypsiboas sp.5* e *Leptodactylus sp.9*), e corroborou a identificação morfológica de cinco espécimes (*Dendropsophus minutus*, *Phyllomedusa nordestina* e *Pipa carvalhoi*).

A utilização do gene mitocondrial 16S rRNA como DNAbarcode se mostrou eficiente na identificação e/ou confirmação das espécies de anuros da Caatinga alagoana.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, U.P.; LIMA ARAÚJO, E. de; EL-DEIR, A.C.A.; LIMA, A.L.A. de; SOUTO, A.; BEZERRA, B.M.; FERRAZ, E.M.N.; FREIRE, E.M.X.; SAMPAIO, E.V.D.S.B.; LAS-CASAS, F.M.G.; MOURA, G.J.B. de; PEREIRA, G.A.; MELO, J.G. de; RAMOS, M.A.; RODAL, M.J.N.; SCHIEL, N.; LYRA-NEVES, R.M. de; ALVES, R.R.N.; AZEVEDO-JÚNIOR, S.M. de; TELINO-JÚNIOR, W.R.; SEVERI, W. 2012. Caatinga revisited: ecology and conservation of an important seasonal dry forest. *The Scientific World Journal* 2012 (205182): 1-18.
- ALJANABI, S. M.; MARTINEZ, E. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25: 4692-4693.
- ALMEIDA, J. P.F. A. de; NASCIMENTO, F. A. C. do; TORQUATO, S.; LISBOA, B. S.; TIRBUICIO, I. C. S.; PALMEIRA, C. N. S.; LIMA, M. G. de; MOTT, T. 2016. Amphibians of the Alagoas State, northeastern Brazil. *Herpetology Notes*, 9: 123-140.
- ASSIS, J. S. 2000. Biogeografia e conservação da biodiversidade – projeções para Alagoas. Maceió São Paulo. Edições Catavento.
- CORREIA, L.L; RODRIGUES, G.D.V.; NASCIMENTO, F.A.C.; LANDELL, M.; MOTT, T. 2014. An integration of molecular and morphological data to identify tadpoles from Área de Proteção Ambiental do Catolé e Fernão Velho, Maceió, Alagoas, northeastern Brazil: a preliminary assessment. *Resumo no II International Symposium on Evolutionary Biology*. V. 35.
- FOUQUET, A.; GILLES, A.; VENCES, M.; MARTY, C.; BLANC, M.; & GEMMELL, N. J. 2007. Underestimation of species richness in Neotropical frogs revealed by mtDNA analyses. *PLoS one*, 2(10), e1109.
- FROST, D. R. 2016. Amphibian Species of the World: an online reference. Version 6. American Museum of Natural History, New York, USA. Disponível em <<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. > Acesso em 04 de outubro de 2016.
- IBGE 2004. Mapa de Biomas e de Vegetação. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm>> Acesso em 04 de outubro de 2016.
- IUCN 2014. The IUCN Red List of Threatened Species. International Union for Conservation of Nature. Disponível em: <http://www.iucn.org/about/work/programmes/species/our_work/amphibians/> Acesso em 04 de agosto de 2016.
- MALKMUS, R. & J. KOSUCH. 2000. Description of a new Ansonia larva (Ansonia guibei) from Borneo. *Salamandra*, 36: 121-124.
- MARES, M.A.; WILLIG, M.R.; LACHER JR, T.E. 1985. The Brazilian Caatinga in South American zoogeography: tropical mammals in a dry region. *Journal of Biogeography* 12: 57-69.
- MORAVEC J.; LEHR E.; CUSI J. C.; CÓRDOVA J. H.; GVOŽDÍK V. 2014. A new species of the *Rhinella margaritifera* species group (Anura, Bufonidae) from the montane forest of the Selva Central, Peru. *ZooKeys*, 371, 35.
- Myers, N.; Mittermeier, R. A.; Mittermeier, C. G.; Fonseca, G. A. B. & Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.

- PEDROSA, I. M. M. de C.; COSTA, T. B.; FARIA, R. G.; FRANÇA, F. G. R.; LARANJEIRAS, D. O.; OLIVEIRA, T.C. S. P. de; PALMEIRA, C. N. S.; TORQUATO, S.; MOTT, T.; VIEIRA, G. H. C.; GARDA, A. A. 2014. Herpetofauna of protected areas in the Caatinga III: The Catimbau National Park, Pernambuco, Brazil. *Biota Neotropica* 14(4): e20140046, 2014.
- POUGH F. H.; JANIS C. M.; HEISER J. B. 2008. *A Vida dos Vertebrados*. 4ª edição. Atheneu, São Paulo. p.684.
- ROBERTO, I.J.; RIBEIRO, S.C.; LOEBMANN, D. 2013. Amphibians of the state of Piauí, Northeastern Brazil: a preliminary assessment. *Biota Neotropica* 13(1): 322–330.
- RODRIGUES, M. T. 2003. Herpetofauna da caatinga. *Ecologia e conservação da Caatinga*, 181-236.
- ROSSA-FERES, D. DE C.; VENESKY, M.; NOMURA, F.; ETEROVICK, P. C.; CANDIOTI, M. F. V.; MENIN, M.; JUNCA, F. A.; SCHIESARI, L. C.; HADDAD, C. F. B.; GAREY, M. V.; ANJOS, L. A. DOS; WASSERSUG, R. 2015. Trazendo a biologia de girinos para o século 21: resultados e metas do Primeiro Workshop Internacional sobre Girinos. *Herpetologia Brasileira*. 4: 2, 35-47.
- SBH 2016. Lista de Anfíbios do Brasil 2016. Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br/index.php/anfibios>> Acesso em 04 de outubro de 2016.
- STUART, S. N.; CHANSON, J. S.; COX, N. A.; YOUNG, B. E.; RODRIGUES, A. S. L.; FISCHMAN, D. L.; WALLER, R. W. 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* 306:1783–1786.
- THOMAS, M.; RAHARIVOLOLONIAINA, L.; GLAW, F.; VENCES, M.; VIEITE, D. R. 2005. Montane tadpoles in Madagascar: molecular identification and description of the larval stages of *Mantidactylus elegans*, *Mantidactylus madecassus*, and *Boophis laurenti* from the Andringitra Massif. *Copeia*, 1: p. 174-183.
- VENCES M., THOMAS M., BONETT R. M., VIEITES D. R. 2005b. Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462):1859-1868.
- VENCES, M.; THOMAS, M.; VAN DER MEIJDEN, A.; CHIARI Y.; VIEITES D. R. 2005b. Comparative performance e of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Frontiers in Zoology*. Londres.
- VERDADE, V. K.; DIXO, M.; CURCIO, F. F. 2010. Os riscos de extinção de sapos, rãs e pererecas em decorrência das alterações ambientais. *Estudos Avançados*, 24(68), 161-172.
- VERDADE, V. K.; VALDUJO, P. H.; CARNAVAL, A. C.; SCHIESARI, L.; TOLEDO, L. F.; MOTT, T.; ANDRADEG, G. V.; ETEROVICKH, P. C.; MENINI, M.; PIMENTAJ, B. V. S.; NOGUEIRAK, C.; LISBOAL, C. S.; PAULAM C. D. DE; SILVANON, D. L. 2012. A leap further: the Brazilian amphibian conservation action plan. *Alytes*, 29(1-4), 28-43.
- VIEITES, D. R.; WOLLENBERG, K. C.; ANDREONE, F.; KOHLER, J.; GLAW, F.; VENCES, M. 2009. Vast underestimation of Madagascar's biodiversity evidenced by na integrative amphibian inventory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, (106) 20: 8267-8272.
- WAKE, D. B.; VREDENBURG, V. T. 2008. Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 105:11466-11473.