

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR – PPGBM

DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES E SUA
APLICAÇÃO EM POPULAÇÕES DE *Melanophryniscus dorsalis* (Anura:
Bufonidae)

Mayara Delagnelo Medeiros

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de
Pós-Graduação em genética e Biologia Molecular da
UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau
de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Professor Orientador: Thales Renato Ochotorena de Freitas
Co-orientador: Jorge Sebastião Bernardo Silva

Porto Alegre, março de 2014.

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho teve seu desenvolvimento no Departamento de Genética, Laboratório de Citogenética e Evolução, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), e contou com o auxílio financeiro de:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS);
- Fundação O Boticário de Proteção a Natureza

Dedico aos meus pais, por
todo apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Eu não poderia deixar de agradecer algumas pessoas que tiveram grande importância durante a realização deste mestrado.

Ao Thales pela orientação, confiança, amizade, por todo apoio ao longo destes dois anos e também por todos os causos contados na hora do café.

Obrigada ao Jorge, uruguaio metido a gaúcho, que aceitou que uma “manezinha da ilha” o auxiliasse durante o doutorado e me apresentou aos “melanos”. Pela amizade, companheirismo e debates nem sempre relacionados ao estudo.

Agradeço à Paula que me ajudou nas análises, interpretação e discussão dos dados e à Lívia que desenvolveu a biblioteca de microssatélites antes da minha chegada ao laboratório.

A todos os colegas de laboratório: Ana, Bruna, Bruno, Caroline, Dalila, Darlise, Daniel, Diego, Fabrício, Fernando, Gisele, Gislene, Graziela, Guilherme, Isadora, Josmael, Jorge, Laura, Leonardo, Lívia, Patrícia, Renan, Samara, Sandra, Tati Noviski e Tati Trigo, pelo companheirismo no dia-a-dia e por tornar o ambiente de trabalho mais agradável.

Agradeço também aos funcionários do Departamento de Genética. Professores e colegas que enriqueceram muito o aprendizado durante as aulas. Ao Elmo, sempre disposto e presente em qualquer problema no PPG. E principalmente à Lúcia e Luciano, pelos auxílios com a burocracia, pelo ambiente descontraído e por todo o apoio durante a ausência do Thales.

Às meninas do lab: Dalila, Darli, Laura, Tati, Gi, Sa, Lívia, Ana e Pati que foram fundamentais pra minha adaptação a Porto Alegre, por me receberem tão bem, fazendo até um chá de casa nova quando ainda mal nos conhecíamos e pela grande amizade que se formou. Muito obrigada por tudo gurias.

Em especial, quero agradecer a Gisele, companheira de desenvolvimento de microssatélites e muitas dúvidas, onde fomos aprendendo muitas coisas juntas, entre erros e acertos. E também à Bruna que me ajudou muito na reta final do mestrado, quando os prazos foram apertando.

Aos colegas que estiveram presentes no laboratório nessa reta final do mestrado e suportaram meu estresse, constantes mudanças de humor, e muita reclamação quando as coisas não saíam como planejado, ou seja, sempre.

Obrigada à todas as pessoas que dividiram apartamento comigo. Algumas experiências boas, outras nem tanto, todas me ensinaram algo. Agradeço especialmente à Vanessa e Míriam pelo companheirismo e parceria.

Aos amigos de Floripa que apesar da distância continuam presentes e sempre abrem uma brecha nos compromissos pra me ver quando eu volto pra lá.

Não poderia deixar de mencionar a minha família, tão importante por tudo que conquistei. Meus pais sempre apoiaram e incentivaram a continuar meus estudos e ir atrás dos meus objetivos. Eram sempre os primeiros a ouvir minhas lamentações quando nem tudo dava certo. Obrigada pela paciência, conselhos e colos. Amo muito vocês.

E por fim, agradeço ao objeto de estudo desse trabalho, os “melanos”, que apesar de toda a dor de cabeça que me causaram nestes dois anos de mestrado e alguns meses acompanhando o doutorado do Jorge, cederam suas vidas em prol da ciência e da, assim esperamos, conservação de seus descendentes e parentes.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	9
INTRODUÇÃO GERAL.....	11
O Gênero <i>Melanophryniscus</i>	12
<i>Melanophryniscus dorsalis</i> (Mertens, 1933)	13
Dispersão, Isolamento por Distância e Barreiras ao Fluxo Gênico	16
Formação e características da Planície Costeira do sul do Brasil.....	18
Marcadores Moleculares	20
OBJETIVOS	22
CAPÍTULO I - Development of microsatellite markers for an endangered red-bellied toad, <i>Melanophryniscus dorsalis</i> (Bufonidae).....	23
Abstract.....	24
Acknowledgements	27
References.....	27
TABLE.....	29
CAPÍTULO II - Genetic diversity and population structure in an endemic threatened red-bellied toad on a highly fragmented habitat, southern Brazil	30
Abstract.....	31
Introduction	32
Material and Methods.....	33
Sampling and Genotyping.....	33
Data analyses	34
Results	36
Discussion.....	38
Acknowledgements	42
References.....	42
TABLES	48
FIGURES	51
DISCUSSÃO GERAL.....	55
REFERÊNCIAS	61

RESUMO

Melanophryniscus dorsalis, conhecido popularmente por flamenguinho, pertence à família Bufonidae (Anura) e apresenta coloração aposemática, com uma linha vermelha médio-dorsal num fundo preto e manchas vermelhas na parte ventral. A espécie possui tamanho pequeno, hábito de vida diurno e reprodução explosiva ligada a grandes precipitações. Seu habitat é caracterizado por campos ou vegetação baixa de dunas em solo arenoso nas zonas costeiras do Rio Grande do Sul e sul de Santa Catarina. É considerada como vulnerável nas listas vermelhas da IUCN, brasileira e do estado do Rio Grande do Sul e em perigo no estado de Santa Catarina. Acredita-se que a espécie tenha sofrido declínios populacionais e sua principal ameaça seja a perda e degradação do habitat devido à urbanização. A fragmentação causada pela degradação do habitat pode levar a um isolamento das populações, e consequente diminuição na dispersão, aumento da endogamia e redução da variabilidade genética, podendo ocasionar diminuição do *fitness*, bem como a capacidade de adaptação a mudanças ambientais. Com o objetivo de avaliar a diversidade genética e estruturação populacional de *M. dorsalis*, foram desenvolvidos marcadores microssatélites e aplicados em populações da espécie ao longo de sua distribuição. *Primers* foram desenhados para nove *loci* de microssatélites desenvolvidos, e caracterizados em 35 indivíduos pertencentes a duas populações. Estes nove *loci* foram utilizados em 80 espécimes, oriundos de 10 locais amostrados entre Laguna (SC) e Rio Grande (RS) englobando toda a distribuição conhecida. A heterozigosidade média observada variou entre 0,47 e 0,64 e o número médio de alelos entre 3,33 e 6,44 nas populações amostradas. Os resultados obtidos mostraram um indício na estruturação genética influenciada por canais d'água como barreiras geográficas ao fluxo gênico, proporcional à distância entre as margens de cada rio ou canal avaliado. O isolamento por distância também foi um fator de diferenciação genética entre as populações amostradas. Foi observada evidência de endogamia em várias localidades, que pode estar relacionada ao modo de reprodução explosiva da espécie. Porém, as três populações testadas para gargalo de garrafa não apresentaram resultados significativos com exceção da localidade de Ilha dos Marinheiros para um dos modelos de

mutação testados, podendo estar relacionado ao isolamento de uma pequena população num ambiente insular e a uma distância considerável das demais populações. Mesmo não demonstrando efeitos de gargalo, é necessária especial atenção à espécie pela constante degradação e fragmentação de seu habitat. As populações devem ser tratadas como diferentes unidades de manejo devido a sua estruturação genética apresentada e vê-se a necessidade da criação de mais unidades de conservação ao longo da distribuição de *M. dorsalis*, para a conservação efetiva da diversidade genética.

ABSTRACT

Melanophryniscus dorsalis, known as “flamenguinho”, belongs to the Bufonidae Family (Anura), has aposematic color with a red middorsal line in a black background and red spots on their ventral portion. The species has small body size, diurnal habits and explosive breeding during heavy rainfalls. Its habitat is characterized by restricted dunes environment with little vegetation cover, along the seacoast of Rio Grande do Sul and south of Santa Catarina states. The species is considered as vulnerable in IUCN's, Brazilian's and Rio Grande do Sul state's Red Lists and endangered in the Red List of Santa Catarina state. It is believed that *M. dorsalis* has undergone population declines and is being threatened mainly for the loss and decline of its habitat due to urbanization. Fragmentation caused by these factors may lead to populations' isolation and less migration between populations, higher levels of inbreeding and genetic variability reduction, and may cause lower fitness, as also less adaptability toward climate changes. The objective in this study was to evaluate genetic diversity and population structure of *M. dorsalis*, throughout its distribution. For that, microsatellite markers were developed and characterized into 35 individuals belonging to two populations. Primers were designed for nine microsatellite *loci*, which were used into 80 specimens from ten distinct localities between Laguna (SC) and Rio Grande (RS). Mean observed heterozygosity ranged from 0.47 to 0.64 while the mean number of alleles, from 3.33 to 6.44 on sampled populations. Results recovered showed an evidence of genetic structure influenced by water channels as geographic barriers for gene flow, according to their range between shores. Isolation by distance was also a factor of genetic differentiation among populations sampled. Evidence of inbreeding was observed in several localities, which might be related to species' explosive breeding behavior. Although, the three populations tested for bottlenecks didn't show significant results with exception of Ilha dos Marinheiros locality for one of mutational models tested. This may be connected to the isolation of a small population in an island. Even without demonstrating bottleneck effects, careful attention toward the species is necessary. Populations must be treated separately as different management units due to the genetic structure observed

and there's a need for the creation of more conservation units throughout *M. dorsalis* distribution in order to conserve genetic diversity effectively.

INTRODUÇÃO GERAL

Os anfíbios atuais são divididos em três ordens: Anura, compreendendo sapos, pererecas e rãs; Caudata, incluindo as salamandras; e Gymnophiona, no qual se encontram as cecílias. Essas três linhagens de anfíbios são tidas como uma linhagem evolutiva monofilética, na qual compartilham vários caracteres derivados (Pough *et al.*, 2008). Análises moleculares geradas por supermatrizes, reunindo genes mitocondriais e nucleares, também indicam a monofilia dos três grupos (Pyron e Wiens, 2011; Frost *et al.*, 2006).

Atualmente são conhecidas cerca de 7200 espécies de anfíbios, sendo em torno de 6300 representando a ordem Anura (Frost, 2014). O número de espécies descritas vem crescendo nos últimos anos e o Brasil é considerado um país megadiverso para o grupo, com 971 espécies descritas, sendo 664 destas, endêmicas (AmphibiaWeb, 2014).

Apesar do crescente número de espécies novas, a diversidade atual de anfíbios encontra-se ameaçada. Desde a década de 1980 vem se observando um declínio no número de espécies e populações presentes em algumas regiões (Stuart *et al.*, 2004). Os motivos destes declínios são a perda de habitat, mudanças climáticas, poluição, radiação UV e também infecções causadas pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Crawford *et al.*, 2010). Pelo menos 43% das espécies de anfíbios estão sofrendo algum tipo de declínio populacional, enquanto apenas 1% apresenta um aumento populacional, e 27% se encontram estáveis. Não há conhecimento quanto às tendências populacionais para os 29% restantes (Stuart *et al.*, 2004).

Em países megadiversos como o Brasil, há poucos trabalhos de monitoramento populacional em larga escala. Portanto, quase nada se sabe sobre o tamanho populacional das espécies e suas oscilações. Os declínios e expansões populacionais de espécies brasileiras são, na maioria das vezes, especulativos (Haddad, 2008) e o conhecimento sobre os anfíbios no Rio Grande do Sul é extremamente fragmentário e basicamente de cunho taxonômico. A falta de conhecimento sobre as espécies existentes é um limitante importante na avaliação da situação de conservação dos anfíbios (Garcia e Vinciprova, 2003).

As principais causas do declínio e extinções locais de anfíbios no Rio Grande do Sul, provocados por ações antrópicas, incluem os desmatamentos, o aproveitamento dos campos nativos para pastagens e reflorestamento com espécies exóticas, a introdução de animais exóticos, como peixes e rãs, o crescimento das áreas urbanas, especialmente no litoral norte, a poluição e assoreamento dos corpos d'água, a chuva ácida, cujos efeitos são ainda desconhecidos no estado, a diminuição da camada de ozônio e a construção de hidrelétricas, estradas e gasodutos (Garcia e Vinciprova, 2003).

O Gênero *Melanophryniscus*

Sapos do gênero *Melanophryniscus* tem distribuição no sul da América do Sul. São encontrados no norte e centro da Argentina, Uruguai, sul do Brasil (Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Mato Grosso do Sul e Espírito Santo), Paraguai, e Bolívia (Kwet *et al.*, 2005; Langone, 1994; Peloso *et al.*, 2012).

O gênero pertence à família Bufonidae e seu aspecto geral é muito similar ao das espécies do gênero *Bufo*. Diferenciam-se destas morfologicamente pela ausência de glândulas paratóides, dobra tarsal e tímpano externo (Langone, 1994). Atualmente são conhecidas 26 espécies para este gênero (Frost, 2014). Segundo Graybeal e Cannatella (1995) *Melanophryniscus* aparenta monofilia e é considerado o grupo irmão de todos os outros bufonídeos (Frost *et al.*, 2006; Pyron e Wiens, 2011).

Há poucos estudos com relação à biologia do gênero. Em geral, *Melanophryniscus* compreende espécies com coloração aposemática, tamanho pequeno a médio e hábito de vida principalmente diurno (Langone, 1994; Kwet *et al.*, 2005; Baldo e Basso 2004). A reprodução nestes sapos é explosiva e está ligada a grandes precipitações, quando muitos indivíduos migram para poças temporárias, podendo ser sazonal ou contínua (Santos *et al.*, 2010; Garcia e Vinciprova, 2003; Langone, 1994).

Sua alimentação consiste principalmente de formigas e em menor proporção ácaros, pequenos besouros, colêmbolos e pulgões (Langone, 1994). Foi verificado em algumas espécies do gênero *Melanophryniscus* a secreção

de até 16 classes de compostos tóxicos alcaloides na pele, fígado e músculo (Grant *et al.*, 2012; Mebs *et al.*, 2005). A presença e quantidade destes compostos apresenta grande variabilidade intra e interespecífica e se encontra ausente em ovos e girinos, sugerindo que essa variação se deve à alimentação de artrópodes que contenham tais toxinas (Mebs *et al.*, 2007; Garraffo *et al.*, 2012; Grant *et al.*, 2012).

O gênero é dividido em três grupos fenéticos: *M. moreirae*, *M. stelzneri* e *M. tumifrons* (Cruz e Caramaschi, 2003). O grupo *M. stelzneri*, compreende sapos de 20 a 30 mm, caracterizados pela presença de espinhos córneos, ausência de tumefação frontal e dorso predominantemente preto (Cruz e Caramaschi, 2003; Langone, 1994). Fazem parte deste grupo, *M. atroluteus*, *M. cupreuscapularis*, *M. dorsalis*, *M. fulvoguttatus*, *M. klappenbachi*, *M. montevidensis*, *M. rubriventris*, e *M. stelzneri* (Cruz e Caramaschi, 2003).

As vocalizações das espécies do grupo *stelzneri* são similares, sendo o canto de *M. dorsalis* muito parecido daqueles de *M. montevidensis*, *M. atroluteus* e *M. stelzneri*. Em todas as quatro espécies, a vocalização típica é composta por dois chamados diferentes. Devido a grande variação intraespecífica no canto dessas espécies, é difícil ao ouvido humano distinguir entre elas. Em média, *M. stelzneri* tem o canto com frequência mais baixa e *M. dorsalis*, mais alta (Kwet *et al.*, 2005).

***Melanophryniscus dorsalis* (Mertens, 1933)**

Melanophryniscus dorsalis, conhecido popularmente por flamenguinho, se diferencia das demais espécies do grupo *stelzneri* pela presença de uma distinta linha vermelha médio-dorsal num fundo preto, que muitas vezes apresenta-se interrompida ou presente apenas como um pequeno traço atrás dos olhos ou acima do ânus. A parte ventral apresenta manchas vermelhas que variam consideravelmente entre os indivíduos (figura 1; Kwet *et al.*, 2005; Cruz e Caramaschi, 2003).



Figura 1. Vista dorsal e ventral de *Melanophryniscus dorsalis* mostrando o fenótipo característico da espécie.

A espécie ocorre ao longo da linha costeira, entre a praia de Itapirubá, no município de Imbituba, sul de Santa Catarina e Ilha dos Marinheiros, em Rio Grande, Rio Grande do Sul. Ainda há um registro da espécie ocorrendo na costa interna da Laguna dos Patos, no município de Arambaré, Rio Grande do Sul (figura 2; Bernardo-Silva *et al.*, 2012).

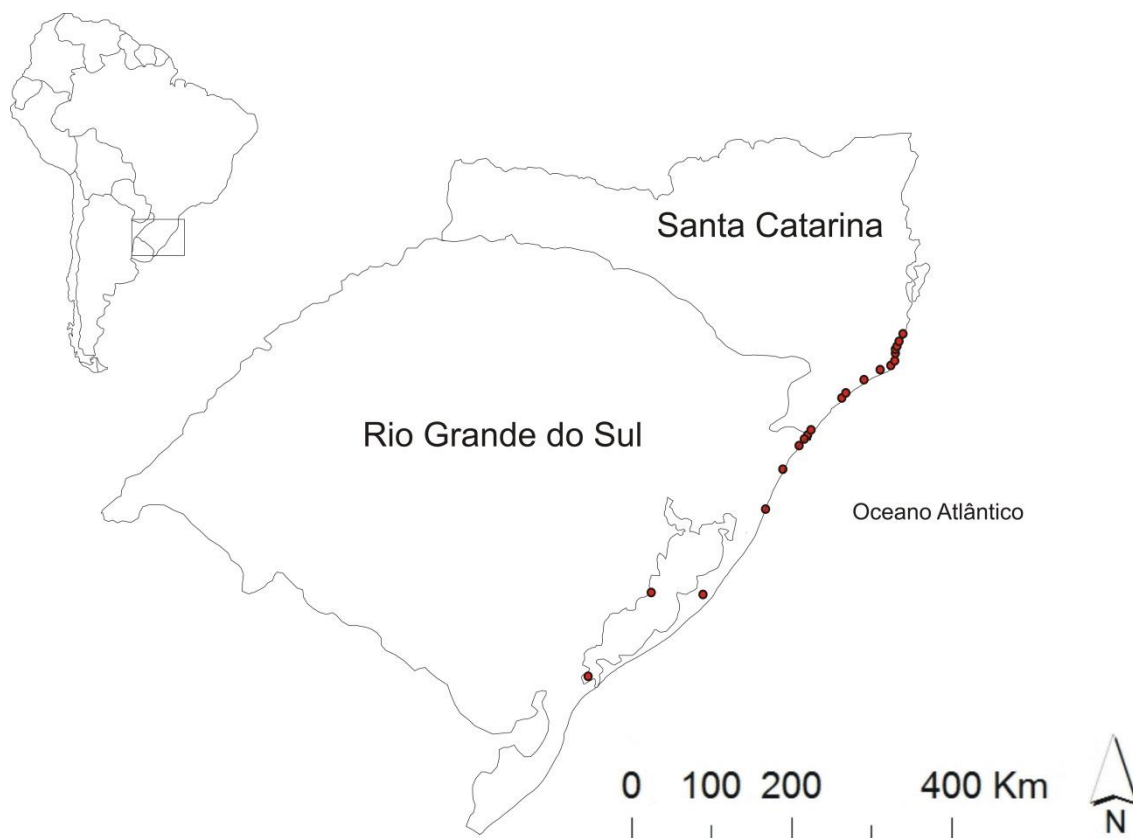


Figura 2. Registros atuais e históricos de ocorrência de *M. dorsalis*, sendo os pontos extremos correspondendo os limites da distribuição (modificado de Bernardo-Silva, 2012)

O habitat que a espécie ocupa é caracterizado por campos ou vegetação baixa em dunas de solo arenoso nas zonas costeiras do Rio Grande do Sul e sul de Santa Catarina (Kwet *et al.*, 2005). Bernardo-Silva *et al.* (2012) realizaram um estudo de modelagem de nicho para a espécie e observaram importantes restrições no seu habitat. Análises genéticas utilizando DNA mitocondrial revelaram que o ancestral comum mais recente da espécie surgiu há cerca de 3,14 milhões de anos. Várias evidências, como a constituição da rede de haplótipos em formato de estrela, testes de neutralidade e análises bayesianas mostram uma expansão populacional há cerca de 0,5 milhão de anos (Bernardo-Silva, 2012). Ainda segundo Bernardo-Silva (2012), não foi possível a detecção de barreiras geográficas ao fluxo gênico e a ocupação da costa se deu provavelmente em duas etapas de colonização: uma formando o extremo norte da distribuição, nos municípios de Imbituba e Laguna, e outra formando as demais populações de *M. dorsalis*, a partir do Farol de Santa Marta, em Laguna.

A espécie reproduz-se em poças temporárias sobre a areia de dunas, em depressões ou nas margens de lagoas costeiras. Os ovos são depositados sob a água, presos à vegetação. A espécie apresenta reprodução explosiva, em períodos de chuva intensa, entre os meses de outubro e março, embora indivíduos sejam encontrados se reproduzindo durante todo o ano. (Haddad, 2008; Kwet *et al.*, 2005). Alimentam-se, principalmente, de formigas e cupins (Haddad, 2008). Foi observado em *M. dorsalis*, assim como em outras espécies do gênero, o comportamento aposemático, no qual o sapo se curva para exibir a coloração intensa da região ventral como forma de defesa (Kwet *et al.*, 2005).

Acredita-se que a espécie tenha sofrido declínios populacionais (Garcia e Vinciprova, 2003) e é considerada como vulnerável no Livro Vermelho da fauna Ameaçada de Extinção do Rio Grande do Sul e Brasileira (Garcia e Vinciprova, 2003; Haddad, 2008). Encontra-se também como vulnerável na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN (IUCN, 2013) devido a sua extensão de ocorrência ser menor que 20.000 km² e a área de ocupação menor que 2.000 km², sua distribuição é bastante fragmentada e seu habitat

apresenta um contínuo declínio na extensão e qualidade (Garcia, 2004). Já em Santa Catarina, a espécie está citada como em perigo (CONSEMA, 2011).

A maior ameaça a *M. dorsalis* é a perda e degradação do habitat devido à urbanização (Garcia, 2004). A área de ocupação desta espécie é alvo de intensa pressão antrópica devido ao crescimento das áreas de balneário e especulação imobiliária. A falta de conhecimento sobre a biologia e as necessidades ecológicas da espécie também são fatores de grande preocupação (Haddad, 2008).

Dispersão, Isolamento por Distância e Barreiras ao Fluxo Gênico

Muitas espécies ameaçadas de extinção enfrentam problemas como perda e fragmentação do habitat, principalmente por atividade humana. A fragmentação pode levar a um isolamento das populações, diminuindo a dispersão de indivíduos entre os fragmentos, aumento da endogamia e redução da variabilidade genética. Essa baixa variabilidade e depressão endogâmica diminui o *fitness* da espécie, bem como a capacidade de adaptação a mudanças ambientais (Frankham *et al.*, 2002). Portanto, a quantificação do fluxo gênico (troca de alelos) entre populações é um importante instrumento de avaliação da diversidade genética presente numa espécie (Allendorf e Luikart, 2007). Esse fluxo gênico ocorre através da dispersão, que é influenciada por interações interespecíficas, disponibilidade de recursos, competição e a variabilidade do habitat, bem como características reprodutivas da espécie (Handley e Perrin, 2007). Anfíbios possuem uma grande variedade de estratégias de dispersão. A maioria das espécies de anuros apresenta uma baixa dispersão, e espera-se que haja diferenciação populacional em distâncias entre populações acima de 10 km (Smith e Green, 2005). A dispersão é importante para a manutenção genética e demográfica de populações adjacentes. Sem o efeito de recrutamento de populações vizinhas, uma espécie com uma alta rotatividade de populações locais e dependentes da dispersão pra sua persistência deve sofrer grandes extinções cumulativas de populações locais em ambientes fragmentados (Green, 2003).

Em populações completamente isoladas, a deriva genética tende a fixar alelos diferentes em cada população. Já o fluxo gênico entre as populações previne a fixação de tais alelos diferentes. Se há diferenças genéticas entre populações locais, quaisquer diferenças que ou diminuem as chances de extinção local ou aumentam as chances de uma população produzir emigrantes ou colonizadores irá afetar a composição genética da espécie (Slatkin, 1987).

É esperado de espécies com pouca dispersão que populações vizinhas sejam mais semelhantes geneticamente que aquelas mais distantes entre si (Allendorf e Luikart, 2007), ou seja, populações próximas tem uma maior troca de indivíduos através da migração, com um alto fluxo gênico, que vai diminuindo com a distância geográfica. Populações remotas podem se tornar diferenciadas simplesmente pelo isolamento por distância, num modelo de dispersão “steppingstone”. Modelos lineares como este são úteis para explicar a estruturação de populações com distribuição linear, como é o caso de *M. dorsalis* (Allendorf e Luikart, 2007).

Populações podem ter composições genéticas diferentes também por barreiras que limitem ou cessem a migração entre ambas. Se o ambiente for favorável, a espécie estenderá sua área de ocorrência até que encontre uma barreira à dispersão. Estas podem ser grandes e conspícuas ou pequenas e difíceis de serem distinguidas (Slatkin, 1987). Se a espécie conseguir atravessar tais barreiras, ainda assim estas podem interferir no fluxo gênico em populações de ambos os lados. Estradas e ambiente altamente urbanizado são descritos como limitantes para a dispersão de anfíbios e diminuição no fluxo gênico (Burskirk, 2012). Florestas secas e montanhas mostraram uma diminuição do fluxo gênico de populações de rã de serapilheira em florestas úmidas (Crawford *et al.*, 2007) e rios apresentam-se como barreiras efetivas para populações de salamandras (Alexandrino *et al.*, 2000).

Formação e características da Planície Costeira do sul do Brasil

No início do Quaternário, há aproximadamente 2,4 milhões de anos, a capa de gelo do Ártico foi formada, transformando o clima na Terra. A partir desta data, as camadas de gelo aumentaram e diminuíram, em ciclos de aproximadamente 40 mil e 100 mil anos (Hewitt, 2000). Essas mudanças na espessura da camada de gelo no Ártico provocaram mudanças em todo o globo, interferindo no clima e nível do mar no hemisfério sul. As flutuações no nível do mar decorrentes de tal variação no Quaternário produziram grandes deslocamentos laterais da linha costeira, moldando a costa do sul de Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Tomazelli *et al.*, 2000). Quatro sistemas de transgressão e regressão do nível do mar, denominados de laguna-barreira são identificados na planície costeira do Rio Grande do Sul e sul de Santa Catarina, sendo três provenientes do Pleistoceno e o último, do Holoceno (Tomazelli *et al.*, 2000; Horn, 2003).

A primeira Barreira localiza-se na faixa mais interior da planície costeira e é o sistema deposicional mais antigo formado pelo primeiro evento de transgressão-regressão do Pleistoceno (Tomazelli *et al.*, 2000). A cada nova ingressão marinha parte da região era submersa, retrabalhando os depósitos ali presentes (Tomazelli e Willcock, 2005). A Barreira II foi formada durante o segundo ciclo de transgressão-regressão do Pleistoceno, sendo responsável pela formação inicial da Lagoa Mirim (figura 3; Tomazelli *et al.*, 2000). Na terceira Barreira, associada a um terceiro evento transgressivo-regressivo pleistocênico, seu desenvolvimento foi responsável pela implantação final das Lagoas dos Patos e Mirim. Os depósitos relacionados à Barreira III se estendem, de maneira quase contínua, ao longo de toda a planície costeira, desde Torres até o Chuí (Tomazelli e Willcock, 2005; Tomazelli *et al.*, 2000). O último sistema de barreira-laguna da planície costeira se desenvolveu durante o Holoceno. O campo de dunas eólicas presente na Barreira IV é bem desenvolvido, variando entre 2 e 8 km de largura e se estendendo praticamente ao longo de toda a linha de costa (Tomazelli e Willcock, 2005). Os quatro sistemas laguna-barreira são interpretados como tendo se formado nos últimos 400 mil anos, sendo a última barreira (IV) formada cerca de 5 mil anos (figura 3; Tomazelli e Willcock, 2005).

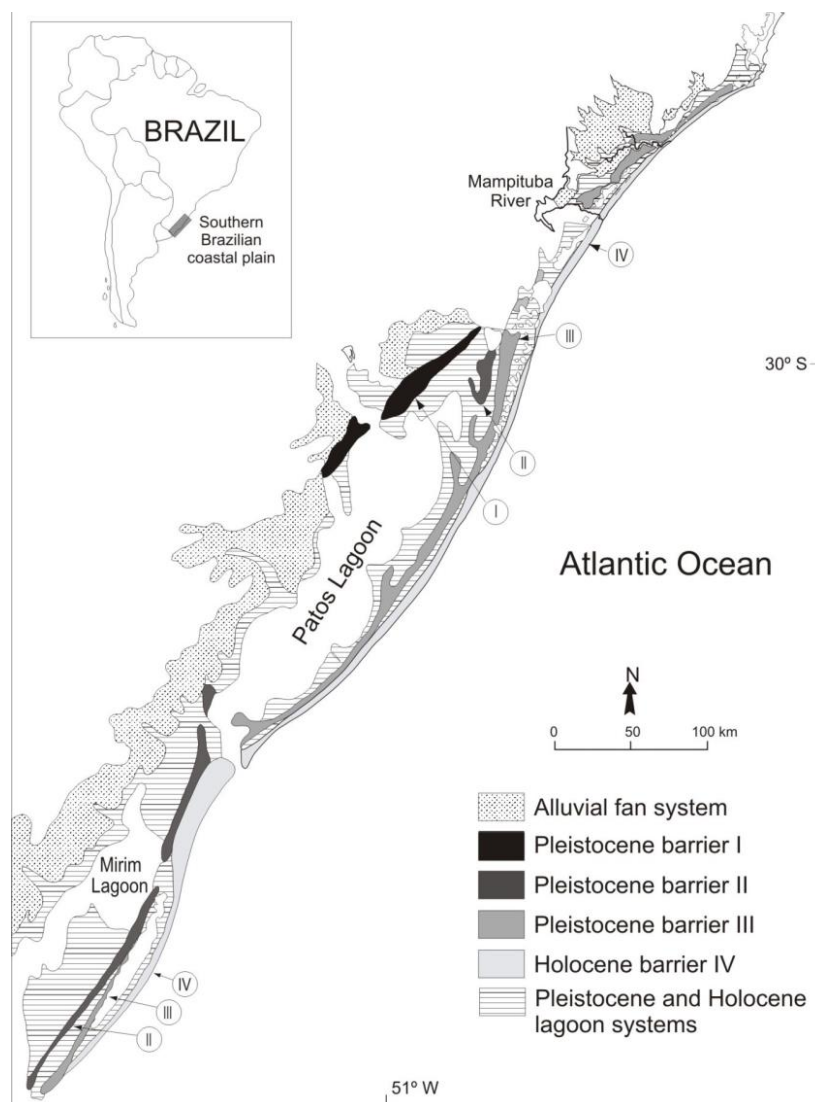


Figura 3. Mapa geológico da planície costeira do Sul do Brasil, com suas quatro formações de barreiras por processos regressivo-transgressivos do nível do mar, compreendendo o sul de Santa Catarina e Rio Grande do Sul (modificado de Tomazelli *et al.*, 2000 e Martin *et al.*, 1988).

Atualmente a planície costeira do Rio Grande do Sul e Santa Catarina tem uma formação irregular, com um complexo sistema de lagos, lagoas e rios. Canais provenientes de lagoas e os estuários dos rios podem servir como barreiras ao fluxo gênico para *M. dorsalis*, interrompendo a costa em alguns pontos do litoral. Indicadores geológicos vêm mostrando que a maior parte da linha costeira do Rio Grande do Sul vem sofrendo erosão. Essa erosão vem sendo causada por fatores de longo e curto prazo. Os fatores de longo prazo seriam o aumento no nível do mar, concentração da energia de ondas devido à

topografia costeira em larga escala e deficiência de areia. Já as causas de curto prazo seriam ressacas geradas a partir de tempestades, concentração de energia das ondas por feições morfológicas submersas em pequena escala, transporte de sedimentos ao longo da costa e atividade humana (Esteves *et al.*, 2002). Um terço do litoral do Rio Grande do Sul vem sofrendo impacto pela atividade humana, como urbanização, mineração de areia e construção de molhes nas desembocaduras de água, mudando a dinâmica de transporte de sedimentos da costa (Esteves *et al.*, 2003).

Marcadores Moleculares

Diversas técnicas da biologia molecular permitem inferir a variabilidade genética nas sequências do DNA dos organismos, ou seja, a detecção de polimorfismo genético. Essas técnicas permitem a obtenção de um grande número de marcadores moleculares, cobrindo quase todo o genoma do organismo. Métodos estatísticos vêm acompanhando este desenvolvimento e têm permitido a manipulação de grandes quantidades de dados (Ferreira e Grattapaglia, 1998; Excoffier e Heckel, 2006).

Os marcadores moleculares permitem o estudo do genoma de organismos com a finalidade de se obter informações acerca de parâmetros como a diversidade e variabilidade genética, o grau de cruzamento aleatório, relações de parentesco, a variância do sucesso reprodutivo de ambos os sexos, estimar a efetividade genética da dispersão de curta e longa distância e distribuição temporal das populações em relação ao fluxo gênico (Frankham *et al.*, 2002; Allendorf e Luikart, 2007). Assim, os marcadores genéticos combinados com atributos demográficos informam a variação dentro de populações locais e também entre elas.

Os marcadores moleculares mais utilizados para a análise e investigação genética de relações evolutivas e populacionais incluem *loci* nucleares altamente polimórficos como os de microssatélites bem como sequências de DNA mitocondrial (mtDNA).

Os microssatélites, também conhecidos como STR (“Short Tandem Repeats”) ou SSR (“Simple Sequence Repeats”) apresentam pequenas

sequências de 1 a 6 nucleotídeos de comprimento, repetidos *in tandem* (Schlötterer, 1998). Possuem *loci* altamente polimórficos, codominantes e seletivamente neutros, encontrados em eucariotos e no genoma de cloroplastos e possuem herança biparental (Jarne e Lagoda, 1996; Schlötterer, 1998). As mutações que ocorrem nos microssatélites são mudanças no número de repetições devido ao deslizamento que ocorre entre a fita-molde e a fita recém-sintetizada durante a replicação (Alberts *et al.*, 2008). Estes erros são responsáveis pela adição ou deleção de repetições que conferem o alto polimorfismo destes locos (Schlötterer, 1998). Por essa alta variabilidade, os microssatélites são bastante indicados para o estudo da variação genética populacional no genoma (Ljungqvist *et al.*, 2010).

OBJETIVOS

Desenvolver marcadores de microssatélites e estimar a variabilidade genética e estruturação em populações de *Melanophryniscus dorsalis* (flamenguinho) ao longo de sua distribuição.

Objetivos específicos:

- Verificar a presença de gargalos de garrafa e fluxo gênico nas populações de *M. dorsalis*;
- Relacionar os resultados obtidos pelos marcadores com a existência de possíveis barreiras geográficas ao fluxo gênico;
- Contribuir com a conservação da espécie através da caracterização molecular das populações ao longo de sua distribuição.

CAPÍTULO I

**Development of microsatellite markers for an endangered red-bellied toad,
Melanophryniscus dorsalis (Bufonidae)**

Mayara D. Medeiros, Lívia Müller, Paula A. Roratto, Jorge S. Bernardo-Silva e
Thales R. O. de Freitas

A ser submetido para Conservation Genetics Resources

Development of microsatellite markers for an endangered red-bellied toad, *Melanophryniscus dorsalis* (Bufonidae).

Mayara D. Medeiros*, Lívia Müller, Paula A. Roratto, Jorge S. Bernardo-Silva e Thales R. O. de Freitas

Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15053, CEP 91501-970 Porto Alegre, RS,

*Correspondence: M. D. Medeiros, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Cx. P. 15053, CEP 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail: mayara_medeiros@hotmail.com

Abstract

Melanophryniscus dorsalis is an endemic threatened species that occur alongside the coastline on southern Brazil. Polymorphic microsatellite markers were isolated and characterized for this species, from a genomic library enriched for (CT)_n and (GT)_n repetitive elements. Primers were designed and nine of them showed reliable polymorphic alleles. They were tested on 35 individuals from two populations. The number of alleles per locus ranged from 2 to 10, the observed and expected heterozygosity ranged within 0.20-0.88 and 0.29-0.82, respectively. These microsatellite markers will be important in future studies within species and help in conservation measures.

Keywords: Anura, genetic diversity, dinucleotide, tetranucleotide, molecular markers, South Atlantic Coastal Plain.

Melanophryniscus dorsalis is an endemic threatened species that occur alongside the coastline on southern Brazil. The occurrence range comprises Brazilian states of Rio Grande do Sul and Santa Catarina. Its habitat is characterized by restricted dunes environment with little vegetation cover, of predominantly small species, along the seacoast (Kwet et al. 2005). *M. dorsalis* have explosive breeding behavior after heavy rainfalls and reproduction occurs

on temporary pools over sand dunes or in the margins of coast lagoons (Haddad 2008; Kwet et al. 2005). The species is considered vulnerable in the IUCN's and Brazilian's Red Lists (IUCN 2013; Haddad 2008). The main threats are considered to be fragmentation and habitat loss due to urbanization and it is believed that populations have undergone great size reductions and have been extinct from some highly urbanized places (Garcia and Vinciprova 2003). The lack of knowledge of the species characteristics like its populations fluctuations are factors of great concern in its conservation (Haddad 2008). The objective in this study was to develop microsatellite markers (short tandem repeat – STR) for *M. dorsalis* for future description of the genetic structure and variability on species' populations throughout its distribution.

Total DNA was extracted of liver or muscle tissues, from 20 samples of the locality Arambaré (ARA) and 15 from Ilha dos Marinheiros (MAR) using Doyle and Doyle (1987) method. For the development of the enriched microsatellite library, one sample from ARA population was used following Zane et al. (2002) method. The DNA was digested with *Afa I* restriction enzyme and then ligated with adapters (Rsa21 5' CTCTTGCTTACGCGTGGACTA 3' and Rsa25 5' TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACCA 3'). Selection of fragments were realized hybridizing DNA with biotinylated probes (CT)_n and (GT)_n. The fragments selected were amplified through Polymerase chain reactions (PCR) with Rsa21 as primer and carried out in a final volume of 100µl with 1x buffer, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM dNTP, 0.4µM primer and 1U of Taq DNA polymerase, with following conditions: 95°C for 4 min, 30 cycles of 94°C for 30 s, 52°C for 45 s, 72°C for 1 min and 30 s and a final extension of 72°C for 8 min. PCR products were checked on an 1% agarose gel, cloned into a pGEM-T vector (Promega) and transferred into XL1-BLUE competent *Escherichia coli* by electroporation.

Clones were sequenced with automatic sequencer ABI 3100 (Applied Biosystems). The programs Chromas v2.01 (Technelysium) and Mega v5.1 (Tamura et al. 2011) were used to check sequences and cut out adaptor sequences. The online program ssrtool (Temnykh et al. 2001) was used to aid the search of microsatellite repetitions and Primer3 Plus (Rozen et al. 2000) to design pair of primers for 27 loci of microsatellite. From that, 17 loci properly amplified and only 9 were polymorphic (table 1). The PCRs were performed

following Schuelke (2000) method, using M13 primer labelled with a fluorescent dye at the 5'-end and a forward primer tailed with a M13 sequence. The PCR mix contained 40ng of DNA, 1x PCR buffer, 4mM MgCl₂, 8pmol of each reverse and M13 primer and 2pmol of the forward primer, 0.4mM of dNTP, 1U of Taq DNA polymerase (Ludwig Biotec), in a total reaction volume of 20μL. Temperature cycles were made under the following conditions: 94°C for 5 minutes, 30 cycles of 94°C for 30s, 53-62°C for 45s and 72°C for 45s, followed by 8 cycles for M13 primer annealing of 94°C for 30s, 53°C for 45s and 72°C for 45s, and a final extension at 72°C for 10 min. PCR's fragments were genotyped in ABI 3100 (Applied Biosystems) at Macrogen Inc. and scored using Peak Scanner v1.0 (Applied Biosystems). The loci were verified for scoring errors and null alleles with Micro-Checker v2.2.3 (vanOosterhout et al. 2004) with a 95% confidence interval and 1000 replicates. Arlequin v3.5.1.2 (Excoffier et al. 2005) was used to calculate observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e) and test Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) and linkage disequilibrium (LD) for both populations, with 10000 steps in Markov Chain/permutations and 1000 dememorization steps. Significant levels of HWE and LD were adjusted with a strict Bonferroni correction considering multiple simultaneous comparisons (Rice 1989).

The number of alleles found on all *loci* ranged from 2 to 10, with a mean number of 6.4 for ARA population and 4.7 for MAR. There was evidence of null alleles for 3 of the 9 loci (Medo1 and Medo3 for ARA and Medo2 for MAR), the same loci that also showed deviations from HWE (table 1). We believe this lack of equilibrium is due to species characteristics as explosive breeding, low dispersal and small population sizes and not from the locus itself, since it was not observed in the same locus for both populations and also other populations analyzed (data not shown). The ARA population was particularly collected during a reproductive event and toads from populations nearby might had migrated to reproduce, possibly causing a Wahlund effect. None of the loci showed LD among them. No evidence of scoring errors was verified for the 9 loci described.

These microsatellite loci are being used on populations of *Melanophryniscus dorsalis* throughout its distribution and will also be tested on

two other species of the genus, one of them also endangered, to verify genetic structure and variability on those species.

Acknowledgements

The authors thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Fundação O Boticário for funding this project. We are grateful to Gisele Oliveira for support with primer designs and Bruna Szywnelski for help in the laboratory.

References

- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 9(1):11-15.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics* 1:47-50.
- Garcia PCA, Vinciprova G (2003) Anfíbios In: Livro Vermelho da fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul. pp 147-164.
- Haddad CFB (2008) Anfíbios. In: Machado et al. (ed) Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Fundação Biodiversitas, Brasília, pp 286-325
- International Union for Conservation of Nature – IUCN (2013) IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.2. www.iucnredlist.org. Accessed February 2014.
- Kwet A, Maneyro R, Zillikens A, Mebs D (2005) Advertisement calls of *Melanophryniscus dorsalis* (Mertens, 1933) and *M. montevidensis* (Philippi, 1902), two parapatric species from southern Brazil and Uruguay, with comments on morphological variation in the *Melanophryniscus stelzneri* group (Anura: Bufonidae). *Salamandra* 41:3-20.

- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43:223–225.
- Rozen S, Skaletsky HJ (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386
- Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18:233-234.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28:2731-2739.
- Temnykh S, Lukashova A, Cartinhour S, DeClerck G, Lipovich L, McCouch S (2001) Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic potential. *Genome Research* 11:1441-1452.
- vanOosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM et al (2004) MICROCHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4:535–538
- Zane L, Bargelloni L, Patarnello T (2002) Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11:1-16.

TABLE

Table 1. Characteristics of 9 microsatellite loci isolated from *Melanophryniscus dorsalis* and genotyped into two populations: Arambaré (ARA) and Ilha dos Marinheiros (MAR)

Loci	Primer 5'-3'***	Repeat motif	AT (°C)	Size range	ARA (n = 20)			MAR (n = 15)		
					Na	Ho	He	Na	Ho	He
Medo1	F: GACTAGCCACAAACGTGCAA R: GGGGAGAAAAACACCAGACA	(AC) ₆	53	271-319	10	0.35	0.81*	4	0.40	0.56
Medo2	F: CCTTACCCTAAGCAGGTGCC R: ATCCTATCCCCCTTTGCACT	(AC) ₈	58	269-295	9	0.58	0.73	5	0.33	0.70*
Medo3	F: CCTAGTGACAACCTGCAGCCA R: TAGTGTCCCCACACTGACCA	(GT) ₇	60	248-272	7	0.24	0.62*	6	0.67	0.76
Medo4	F: TCCCTTTACACAAACAGACA R: TTCAAATTGATTGCTAAGTGTGTTT	(AC) ₅	57	295-299	3	0.47	0.60	2	0.20	0.29
Medo5	F: TTCGTGTTTTTTGGTCAATTAGG R: CAGAAAGTAATAAACATGCCTTAAAC	(GA) ₁₆	59	110-116	4	0.53	0.57	3	0.67	0.54
Medo6	F: TAATGACTGTCACAGGGTGGAG R: CGGGATTTATTCTTGTGTGGAT	(TAGA) ₁₀	60	164-204	7	0.88	0.82	7	0.87	0.82
Medo7	F: GTCTTGGTGATGCAGTGTTGTT R: CAGGCTGTCTTCTTCCCATAGT	(GT) ₉	60	165-183	8	0.71	0.82	5	0.53	0.72
Medo8	F: ATCAGCAAGGTAGGTTTTCTGG R: GAGCAGAGAGTCAGTGAGAGCA	(CA) ₉	62	264-290	7	0.65	0.82	6	0.80	0.76
Medo9	F: GGATGCTATCATACAAGCAC R: GTAGAAGTGGTCCAGAGGTC	(AC) ₅₋₇	60	91-99	3	0.41	0.44	4	0.80	0.71

AT – annealing temperature; Na – number of alleles; Ho – observed heterozygosity; He – expected heterozygosity

*Departure from HWE after Bonferroni Correction ($\alpha = 0.006$).

**Forward primers were M13 tailed at the 5' end.

CAPÍTULO II

Genetic diversity and population structure in an endemic threatened red-bellied toad on a highly fragmented habitat, southern Brazil

Mayara D. Medeiros, Jorge S. Bernardo-Silva, Paula A. Roratto e Thales R. O. de Freitas

Artigo em preparação a ser submetido para Conservation Genetics

Genetic diversity and population structure in an endemic threatened red-bellied toad on a highly fragmented habitat, southern Brazil

Mayara D. Medeiros*, Jorge S. Bernardo-Silva, Paula A. Roratto, Thales R. O. de Freitas

Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15053, CEP 91501-970 Porto Alegre, RS,

*Correspondence: M. D. Medeiros, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Cx. P. 15053, CEP 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail: mayara_medeiros@hotmail.com

Abstract

Melanophryniscus dorsalis is an endemic threatened species that occurs alongside coastline, in Brazilian south Atlantic coastal plain. Species habitat is restricted to dunes environment with little vegetation cover of predominantly small species along the seacoast. Microsatellite markers were used to assess genetic variability and structure among populations. Results showed a structuring pattern influenced by rivers and inlets as barriers to gene flow, according to the rivers' range. Isolation by distance also influence the pattern found in *M. dorsalis* isolation, congruent to species features such as low dispersal and small population sizes. Despite no clear evidence of bottlenecks and genetic diversity loss, populations require attention due to habitat loss and fragmentation by human activity and the explosive breeding behavior. This might lead to high levels of inbreeding depression and increase population reductions and local extinctions.

Keywords: *Melanophryniscus dorsalis*, microsatellites, isolation by distance, gene flow barrier, South Atlantic Coastal Plain.

Introduction

Many threatened species suffer with habitat loss and fragmentation, mainly caused by human activity. Evaluate genetic diversity helps elucidate how species might be responding to these changes in habitat that may lead to populations' isolation, decreasing migration among them and enhance inbreeding depression, causing fitness reduction (Frankham et al. 2002). Gene flow among populations occurs with individuals' migration. Dispersal in general depends on interspecific interactions, resources availability, competition, habitat variability and reproduction characteristics of the species (Handley e Perrin, 2007). Most of amphibians are low dispersers and differences between populations are expected within 10 km (Green and Smith, 2005). In this case, neighboring populations tend to be more similar than those with higher distances and species presents a population genetic structure related to isolation by distance (Allendorf and Luikart, 2007). Barriers may also contribute to population differentiation, and they can be large and conspicuous or small, being difficult to identify them (Slatkin, 1987), such as rivers, mountains and roads (Eriksson et al. 2004; Crawford et al. 2007; Arora et al. 2010; Burskirk 2012).

Since 1980, it's been observed a continuum decrease in amphibian populations, leading some of the species to extinction (Stuart et al. 2004). The main reasons for these declines are habitat loss, climatic changes, pollution, UV radiation and infections caused by *Batrachochytrium dendrobatidis* (Crawford et al. 2010). In mega diverse countries such as Brazil, there are few population monitoring studies and population trends are, most of the times, speculative (Haddad 2008). An interesting group of amphibians, that include a few species in a several red lists, is the genus *Melanophryniscus*, from Bufonidae family. Species in this genus have small sizes, aposematic coloration, presence of alkaloids in their skins and other tissues, and are mainly diurnal (Langone 1994; Baldo and Basso 2004; Grant et al. 2012). Unlike most amphibians' they have explosive breeding behavior after heavy rainfalls and reproduction occurs in small temporary ponds or in the banks of lakes (Haddad 2008; Kwet et al. 2005).

Melanophryniscus dorsalis (Mertens 1933), known as "flamenguinho", is an endemic species that occurs alongside coastline, in Brazilian south Atlantic

coastal plain, and ranges from Itapirubá beach in Imbituba municipality (Santa Catarina state, SC) to Marinheiro's Island, in Rio Grande municipality (Rio Grande do Sul state, RS). There is also a western registry in Arambaré, RS, occurring in the intern coastline of Patos Lagoon (Bernardo-Silva et al. 2012).

This species habitat's restricted dunes environment with little vegetation cover of predominantly small species along the seacoast (Kwet et al. 2005). Recently ecological niche modelling showed its habitat is very restrictive, with high suitability only on coastal plain, and review new localities for the species (Bernardo-Silva et al. 2012). Little is known about the biology, ecology and population fluctuations in this species and it is believed that populations' sizes have been in decrease (Haddad 2008; Garcia and Vinciprova 2003). *Melanophryniscus dorsalis* is considered as vulnerable in the Red List of the International Union for Conservation of Nature as also in the Red Book of Brazilian Endangered Fauna due to habitat loss and distribution's fragmentation (IUCN 2013; Haddad 2008). The distribution range is greatly affected by anthropic activity and the lack of knowledge towards this species is of high concern (Haddad 2008). The objective of this study was to assess genetic diversity and structure of *M. dorsalis*, using microsatellite markers, in order to evaluate current populations' status and promote species conservation.

Material and Methods

Sampling and Genotyping

Specimens were collected along species distribution, on 10 different localities (table 1; figure 1), between the years of 2009-2011, in southern Brazil coastal plain. In order to test great water channels as barriers for *M. dorsalis*, we collected individuals on either sides of each inlet with distances between populations ranging from 5 to 10 km. The barriers analyzed were Laguna's Inlet, with approximately 250m of distance from shores, constituted of sea water. This first water corpse physically separates GRO and IPU populations, in the north of species distribution. Following south, the next barrier tested was Araranguá River, ranging 150 to 200 meters from riverbanks and separating ILH and CON. Lastly,

the Mampituba River is between PAT and GUA localities, with 100 to 150m wide (figure 1). Individuals collected were conserved in 100% ethanol.

Total DNA was extracted of liver or muscle tissue from 80 samples using Doyle and Doyle (1987) method. Sample DNA concentrations were measured in NanoDrop® 1000 (Uniscience), diluted into aliquots of 10ng/μl, and were stored at -20°C. It was used 9 polymorphic loci of microsatellite to conduct the study: Medo1, Medo2, Medo3, Medo4, Medo5, Medo6, Medo7, Medo8 and Medo9 described by Medeiros et al. (in prep). Polymerase chain reactions (PCRs) were performed following Schuelke (2000) method, using M13 primer labelled with a fluorescent dye at the 5'-end and a forward primer tailed with a M13 sequence. The PCR mix contained 40ng of DNA, 1x PCR buffer, 4mM MgCl₂, 8pmol of each reverse and M13 primer and 2pmol of the forward primer, 0.4mM of dNTP, 1U of Taq DNA polymerase (Ludwig Biotec), in a total reaction volume of 20μL. The reactions were made with one pair of primers at a time, following Medeiros *et al.* (in prep). PCR's products were combined when having different fluorescent dyes and sizes, genotyped in ABI 3100 (Applied Biosystems) at Macrogen Inc. and scored using Peak Scanner v1.0 (Applied Biosystems). PCRs of samples were carried out as many times as needed and double-checked in order to obtain reliable allele scorings.

Data analyses

The loci were verified for scoring errors and null alleles with Micro-Checker v2.2.3 (vanOosterhout et al. 2004) with a 95% confidence interval and 1000 replicates. Arlequin v3.5.1.2 (Excoffier et al. 2005) was used to analyze genetic diversity, test for Hardy-Weinberg equilibrium with 10,000 steps in Monte Carlo Markov Chain (MCMC) and 1,000 dememorization steps and linkage disequilibrium with 10,000 permutations. The same program was also used to calculate genetic diversity, pairwise F_{ST} and R_{ST} with 10,000 permutations for each test. Significant levels of HWE, LD and pairwise F_{ST} and R_{ST} were adjusted with a strict Bonferroni correction considering multiple simultaneous comparisons (Rice 1989). We estimated number of migrants (N_m) in Genepop v4.2 (Rousset 2008). A

Mantel test, with 1,000 replicates, and an autocorrelation analysis, with 5,000 random replicates and five to eight distance classes applied, were performed in Arlequin and Alleles in Space v1.0 (Miller 2005) respectively, to verify for isolation by distance.

Population reduction size was tested on Bottleneck v1.2.02 (Cornuet and Luikart 1996) for three populations (CON, ARA, MAR) that have more than 10 individuals, with 1,000 replications under stepwise mutation (SMM) (Kimura and Ohta, 1978) and two-phase mutation (TPM) (Di Rienzo et al. 1994) models of microsatellite evolution. For the TPM model, we set parameters in default at 70% single step mutations. One-tailed Wilcoxon tests were used to determine the significance of heterozygosity excess or deficiency for each population, since it was the most powerful analysis for our data (few loci and individuals).

We used two Bayesian approaches to analyze genetic structure and cluster assignment among samples with and without spatial data. Structure v2.3.4 (Pritchard et al. 2000) was defined with ten independent runs for each K, ranging from 1 to 10 with 10^6 iterations for MCMC and $5 \cdot 10^5$ iterations for burn-in, assuming the admixture model and independent allele frequency. We set runs with the LOCPRIOR model, which incorporates putative population information. This model allows a better performance where there are too few loci or individuals, or not enough divergence (Hubisz et al. 2009). We also made a second run with same parameters as above but no population information a priori to confirm the results. To infer the best number of clusters (K) for the data, methodologies from Pritchard (2000), considering the highest mean value of estimated logarithm of probability [$\ln Pr(X/K)$] and lowest standard deviation (SD), and Evanno et al. (2005), considering the highest value of delta K, were evaluated, using Structure Harvester (Dent and vonHoldt 2012). Replicates generated were combined with Clumpp v1.1.2 (Jakobsson and Rosenberg 2007) and graphs of assignment probability, built in Distruct v1.1 (Rosenberg 2004).

Geneland v3.2.4 (Guillot et al. 2008) analysis included the geographic coordinates for each site. We made a first run to infer the appropriate number of clusters (K), with 10^6 iterations of MCMC saving every 100 iteration, uncorrelated allele frequencies, presence of null alleles as true and uncertainty of spatial

coordinates at 200m, considering the low locomotion capacity of these small toads. For confirming the best number of clusters, we did ten more independent runs with the same parameters and K fixed at the value inferred at the beginning. Posterior probability was computed using a burn-in of 2,000 iterations, and pixels were defined in 100 for X and Y axes. The best run was chosen by the highest value of posterior probability.

Analyses of molecular variance (AMOVA) were performed in Arlequin at individual level, calculated F_{IS} to each population with 10,000 permutations and tested populations' differentiation with no priori groups defined. We also set two hypothesized scenarios of subdivision. The first group division was set considering higher distances as dividers between populations, forming 5 groups (GRO/FSM/IPU x ILH/CON x PAT/GUA/ITA x ARA x MAR). The second was generated according to hypothesized natural barriers for gene flow. We considered Laguna's inlet, Araranguá River, Mampituba River (as shown in figure 1) and distance for the two southern localities as the barriers, dividing populations into 6 groups (GRO x IPU/FSM/ILH x CON/PAT x GUA/ITA x ARA x MAR).

Results

The total number of alleles per locus ranged from 4 to 15, and from 1 to 10 per locus per locality. GRO showed one monomorphic locus (Medo9). Mean number of alleles and mean observed and expected heterozygosity are shown in table 1. All loci presented no scoring errors when checked with Micro-checker, and no LD was observed for the 9 loci in all populations ($P > 0.001$ after Bonferroni correction). However, evidence of null alleles was observed for GRO (Medo2), IPU (Medo6), ILH (Medo6), CON (Medo8), ARA (Medo1 and Medo3) and MAR (Medo2). The same loci that presented null alleles evidence also showed departures from HWE (table 1). Given the inconsistent pattern of null allele detection among loci, none were excluded for subsequent analyses. When analyzing inbreeding coefficient (F_{IS}) for each population we found moderate and significant results for GRO, IPU, FSM, ILH, CON and ARA. The results for pairwise F_{ST} showed moderate and significant differentiation for almost all

comparisons for GRO, FSM, ARA and MAR (table 2). The southernmost population (MAR) showed the greatest values of F_{ST} . GRO x IPU, between where Laguna's inlet is located, showed moderate F_{ST} (0.1246). ILH x CON and PAT x GUA, also evaluated for water channels as barriers, were non-significant. R_{ST} pairwise results were non-significant with the exception of ARA x MAR comparison, with a R_{ST} similar to the one found in F_{ST} . Estimation for the number of migrants gave a value of 1.937 after correction for size.

The Mantel ($r=0.6254$, $p<0.001$) and spatial autocorrelation analyses (figure 2) showed a positive significant correlation between genetic and geographical distances. The autocorrelation analysis indicated that genetic distance increase with geographical distance until approximately 100 km, when the maximum genetic differentiation is reached.

For the three populations tested for bottlenecks, ARA showed allele frequencies under the L-shaped distribution and non-significant p value for the Wilcoxon sign rank test in both SMM and TPM models. Although CON population showed non-significant results for Wilcoxon's test, there was a shifted mode distribution for allele frequencies expected under no population constraint. Considering the southern population, MAR, the L-shape allele frequency was observed, but Wilcoxon sign rank test under TPM model was significant for heterozygosity excess.

The results from the program Structure suggested an ideal K as 4 by the highest mean LnPd value (figure 3A) and $K=3$ when analyzed by the delta K method (figure 3B), with and without population information a priori. Considering the number of clusters of 3, populations from the north (IPU, FSM, ILH, CON, PAT and GUA) grouped in a cluster and ITA clustered with ARA. The population of MAR, in the extreme south of distribution, appeared as an isolated cluster. Only GRO and GUA showed mixed ancestry, with less than 0.700 of probability to belong to one of the three clusters (figure 3C). While $k=4$, both ARA and MAR populations formed isolated clusters (clusters 2 and 3 respectively, table 3). At the north of distribution, populations can be divided into two other clusters of GUA and CON (cluster 1), and IPU and FSM (cluster 4). Four populations, GRO, ILH, PAT and ITA, showed mixed ancestry (table 3, figure 3D).

When adding geographical information of populations on the clustering approach, Geneland also gave the most likely number of clusters as $K=4$ (figure 4A). When we set a fixed K at 4, however, the 10 localities sampled were assigned into three clusters, and the fourth was a “ghost cluster”, with no sampling site belonging to it. According to Guillot et al. (2005) this “ghost clusters” may appear due to departures of the data from modelling assumptions or a lack of MCMC mixing. These spurious populations might just be ignored and focus can be restricted to modal populations. The clusters retrieved by this analysis consisted of a first one reuniting the northern populations of GRO, IPU, FSM, ILH, CON, PAT and GUA. The second grouped ITA and ARA sites and the third cluster comprised MAR population, southern distribution (figure 4B), the same clusters recovered by Structure analysis of $k=3$.

AMOVA results at individual level showed 70.07% of genetic variation being within population, while 11.55% is explained among populations and 18.38% among individual within populations, giving significant values of $F_{IT} = 0.30$, $F_{ST} = 0.12$ and $F_{IS} = 0.21$ ($p < 0.0001$), while variability among all populations without groups defined was 12.81% ($F_{ST} = 0.13$, $p < 0.0001$). Considering AMOVA analyses to test for populations subdivisions, the main genetic diversity observed is found inside populations, among individuals in both subdivision analyses (~87%). The two tests showed significant results for the groups tested and the six groups set, with water channels as barriers presented the highest percentage explaining genetic variability ($F_{CT} = 0.10$; $p < 0.001$; table 4).

Discussion

Understand genetic diversity is an important tool to drive in conservation efforts, even more important in endangered species. The habitat of *M. dorsalis* is highly impacted by human activity and therefore may bring a risk for genetic status. Fragmentation and habitat loss has great impact on biodiversity (Fahrig 2003). This could lead to a loss of variability, high levels of inbreeding and consequently a less adaptability to environmental changes. Increased inbreeding showed to be related to increased larval mortality in *Hyla arborea* and is less severe

in populations more conserved (Andersen et al. 2004). Therefore, the similar values of inbreeding found in this study with the ones in Andersen et al. (2004) could be a disadvantage for genetic status of the species, especially in disturbed habitat populations and require attention on future procedures in species management. Even though, these inbreeding values could be due to *M. dorsalis* natural characteristics such as low dispersal, explosive breeding and small population sizes. Short and explosive breeding seasons contribute to high reproductive skew, reducing effective population sizes and potential inbreeding in isolated populations (Dixo et al. 2009). Despite F_{IS} values, all populations showed high and similar allelic diversity with expected heterozygosity ranging between 0.6108-0.7333. Although a significant result for bottleneck was found under TPM for MAR, the same was not observed for SMM or allele frequencies. This might have occurred because this particular population is located on an island and is more prone to population size fluctuations and genetic drift. The other two populations tested for bottleneck showed no sign of reduction sizes. Despite that, *M. dorsalis* habitat is continually being degraded due to urbanization. There are places with historic registries for the species occurrence that specimens are no longer found, in Rio Grande do Sul state (Bernardo-Silva et al. 2012). That might indicate a population reduction in these localities or even local extinction, contributing to isolation of south populations from the northern distribution. These localities have been suffering great anthropic influence in recent decades like urbanization, human occupation, sand mining and construction of jetties (Esteves et al. 2003).

Mantel and autocorrelation analyses showed a high correlation between geographic distance and genetic differentiation, indicating isolation by distance among populations, also verified by clustering in Bayesian analyses. Therefore, gene flow occurs in a stepping stone mode, as expected for a linear distribution and low vagility of *M. dorsalis*. Genetic distances increase within long distances and populations are highly differentiated up to 100 km. Isolation by distance is commonly found in amphibian species in different habitats (Monsen and Blouin 2004; Nair et al. 2012; Knopp and Merilä 2009; Hale et al. 2012) and with other

low vagility species in the same habitat and also with linear distribution (Lopes et al 2013; Fernández-Stolz 2007).

In our results, we could observe an influence of the water channels tested as effective barriers through AMOVA analysis, which showed significant values of F_{ST} and F_{CT} (table 4). This was also verified for Bayesian assignment with the program Structure, showing a break in structure on populations on each shore (figure 3). Laguna's Inlet might be considered a barrier for gene flow between the upper north population (GRO) and the rest of *M. dorsalis* populations since, besides inferences cited above, we could see significant moderate pairwise F_{ST} results (table 2). Its seawater and wide distance between shores might difficult migrants exchange between localities and even contribute to limit species' distribution to north, since niche modeling show high environmental suitability beyond it (Bernardo-Silva et al. 2012). In the same way, Patos Lagoon inlet could also represent a limiting factor to south distribution in the coastal plain, being larger than Laguna's Inlet. However, we could not test Patos Lagoon as a barrier to gene flow since there are only two southern populations sampled with great distances from any other. Araranguá and Mampituba Rivers presented a lesser sign of barrier effectiveness in prevent gene flow between localities, with no significant pairwise F_{ST} (table 2), or our low number of samples couldn't detect its sign through this analysis. We could see a tendency of decrease in barriers' effectiveness according to distances between river banks, that is, populations between smaller water channels have higher gene flow than those between bigger inlets. Studies demonstrate rivers as effective barriers for amphibian populations (Li et al. 2009; Alexandrino et al. 2000) and even large animals such as primates (Arora et al. 2010; Eriksson et al. 2004). On the other hand, Buskirk (2012), in a study conducted with two species of amphibians, showed that highways and roads have significant impact on gene flow while rivers don't, and urban habitats are the most resistant landscape cover to movement. Although the results showed in this study, there were no clear signs of rivers being effective barriers in mtDNA data for the same samples as verified by Bernardo-Silva (2012). In fact, mtDNA presented evidences of a recent expansion through neutrality tests and Bayesian skyline analysis, starting around 0.5 Mya (Bernardo-Silva, 2012). This expansion is

congruent to colonization of coastal plain in southern Brazil, which was formed with successive transgression-regression events at the sea level during quaternary, from 0.4 Mya to 5 Kya (Tomazelli and Willwock 2005). Mitochondrial DNA usually reflect historical events, due to its lower effective population sizes, while microsatellites are more variable and potentially homoplastic, and best used to explain recent events. Moreover, transient river courses, particularly in river mouths throughout coastal plain formation (Tomazelli and Wilwock 2000), might have led to a lack or low signal of structure between populations surrounding rivers in a more ancient history. Lopes et al. (2013) found similar results for a subterranean rodent species, *Ctenomys minutus*, with microsatellite indicating structuring congruent with the same hypothesized barriers, though not with mtDNA.

Melanophryniscus dorsalis populations are structured throughout its distribution and we recommend treating them as different management units according to clusters formed and previous studies considering this species (Bernardo-Silva et al. 2012; Bernardo-Silva 2012). Although *M. dorsalis* presented a high genetic diversity in all populations, moderate F_{ST} and isolation by distance indicate there is not much gene flow occurring between localities. Increasing fragmentation caused by habitat loss in a low dispersal species will lead to populations isolation and genetic drift will act independently in each one of them (Luoy et al. 2007), being more susceptible to local extinctions. As suggested by Bernardo-Silva et al. (2012), we also recommend the creation of more conservation units within *M. dorsalis* range. There are only two units comprising the species (Guarita and Itapeva State Park), both located in Torres municipality, RS. In SC state, there is Baleia Franca APA, near Morro dos Conventos locality, in Araranguá, although only marine species are within its protected area. This is a central locality in northern distribution and could be important for conservation of nearby northern populations, facilitating gene flow. The results generated in this study could aid the adoption of conservation measures not only for *M. dorsalis*, but also benefiting other threatened species such as the subterranean rodent *Ctenomys flamarioni* and lizard *Liolaemus occipitalis* (IUCN 2013) which occur in a similar range distribution.

Acknowledgements

The authors thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Fundação O Boticário for funding this project. We are grateful to Bruna Szynewski for support in the laboratory and other laboratory colleagues and staff for help at various stages of this research.

References

- Alexandrino J, Froufe E, Arntzen JW, Ferrand N (2000) Genetic subdivision, glacial refugia and postglacial recolonization in the golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica* (Amphibia: Urodela). *Molecular Ecology* 9:771–781.
- Allendorf FW, Luikart G (2007) Conservation and the genetics of populations. Blackwell, London.
- Arora N, Nater A, Van Schaik CP, et al. (2010) Effects of Pleistocene glaciations and rivers on the population structure of Bornean orangutans (*Pongo pygmaeus*). *Proc Natl Acad Sci USA* 107:21376–81
- Baldo D, Basso NG (2004) A New Species of *Melanophryniscus* Gallardo, 1961 (Anura: Bufonidae), with Comments on the Species of the Genus Reported for Misiones, Northeastern Argentina. *Journal of Herpetology* 38:393–403.
- Bernardo-Silva JS (2012). História evolutiva e conservação de duas espécies de sapinho-da-barriga-vermelha *Melanophryniscus dorsalis* e *Melanophryniscus montevidensis*. Thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Bernardo-Silva J, Martins-Ferreira C, Maneyro R, Freitas TRO de (2012) Identification of Priority Areas for Conservation of Two Endangered Parapatric Species of Red-bellied Toads Using Ecological Niche Models and Hotspot Analysis. *Brazilian Journal of Nature Conservation* 10:207–213.
- Buskirk J (2012) Permeability of the landscape matrix between amphibian breeding sites. *Ecology and Evolution* 2:3160–7.

- Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144:2001-2014.
- Crawford AJ, Bermingham E, Polanía C (2007) The role of tropical dry forest as a long-term barrier to dispersal: a comparative phylogeographical analysis of dry forest tolerant and intolerant frogs. *Molecular Ecology* 16:4789–4807.
- Crawford AJ, Lips KR, Bermingham E (2010) Epidemic disease decimates amphibian abundance, species diversity, and evolutionary history in the highlands of central Panama. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:13777–82.
- Doyle JJ, Doyle, JL (1987) A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 9(1):11-15.
- Di Rienzo A, Peterson AC, Garza JC, Valdes AM, Slatkin M, Freimer NB (1994) Mutational processes of simple sequence repeat loci in human populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:3166-3170.
- Earl DA, vonHoldt BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4(2):359-361.
- Eriksson J, Hohmann G, Boesch C, Vigilant L (2004) Rivers influence the population genetic structure of bonobos (*Pan paniscus*). *Molecular Ecology* 13:3425–35
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14(8):2611–20.
- Esteves LS, Silva ARP, Arejano TB, Pivel MAG, Vranjac MP (2003) Coastal development and human impacts along the Rio Grande do Sul beaches, Brazil. *Journal of Coastal Research* 35:548-556.

- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics* 1:47-50.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press.
- Fernández-Stolz GP (2007). Estudos evolutivos, filogeográficos e de conservação em uma espécie endêmica do ecossistema de dunas costeiras do sul do Brasil, *Ctenomys flamarioni* (Rodentia - Ctenomyidae), através de marcadores microssatélites e DNA mitocondrial. Thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 193 p.
- Garcia PCA, Vinciprova G (2003) Anfíbios In: Livro Vermelho da fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul. pp 147-164.
- Grant T, Colombo P, Verrastro L, Saporito RA (2012) The occurrence of defensive alkaloids in non-integumentary tissues of the Brazilian red-belly toad *Melanophryniscus simplex* (Bufonidae). *Chemoecology* 22:169–178.
- Green DM (2003) The ecology of extinction: population fluctuation and decline in amphibians. *Biology Conservation* 111:331-343.
- Guillot G, Estoup A, Mortier F, Cosson JF (2005) A spatial statistical model for landscape genetics. *Genetics* 170:1261–80.
- Guillot G, Santos F, Estoup A (2008) Analysing georeferenced population genetics data with Geneland: a new algorithm to deal with null alleles and a friendly graphical user interface. *Bioinformatics* 24(11):1406-1407.
- Haddad CFB (2008) Anfíbios. In: Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Fundação Biodiversitas, Brasília, pp 286-325
- Hale JM, Heard GW, Smith KL, et al. (2012) Structure and fragmentation of growling grass frog metapopulations. *Conservation Genetics* 14:313–322.

- Handley LJJ, Perrin N (2007) Advances in our understanding of mammalian sex-biased dispersal. *Molecular Ecology* 16:1559–78.
- Hubisz MJ, Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2009) Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources* 9:1322–1332.
- International Union for Conservation of Nature – IUCN (2013) IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.2. www.iucnredlist.org. Accessed February 2014.
- Jakobsson M, Rosenberg NA (2007) CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23:1801–1806.
- Kimura M, Ohta T (1978) Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proc Natl Acad Sci* 75:2868-2872
- Knopp T, Merilä J (2009) Microsatellite variation and population structure of the moor frog (*Rana arvalis*) in Scandinavia. *Molecular Ecology* 18:2996–3005.
- Kwet A, Maneyro R, Zillikens A, Mebs D (2005) Advertisement calls of *Melanophryniscus dorsalis* (Mertens, 1933) and *M. montevidensis* (Philippi, 1902), two parapatric species from southern Brazil and Uruguay, with comments on morphological variation in the *Melanophryniscus stelzneri* group (Anura: Bufon. SALAMANDRA 41:3–20.
- Langone JA (1994) Ranas y sapos del Uruguay. Museo Damaso Antonio Larrañaga 5:124.
- Li R, Chen W, Tu L, Fu J (2009) Rivers as barriers for high elevation amphibians: a phylogeographic analysis of the alpine stream frog of the Hengduan Mountains. *Journal of Zoology* 277:309–316.
- Lopes CM, Ximenes SSF, Gava A, Freitas TRO (2013) The role of chromosomal rearrangements and geographical barriers in the divergence of lineages in a

- South American subterranean rodent (Rodentia: Ctenomyidae: *Ctenomys minutus*). *Heredity* 111:293-305.
- Mertens R (1933) Über zwei südamerikanische Froschlurche der Gattungen *Dendrophryniscus* und *Gastrotheca*. *Zool Anz* 102:257-260.
- Miller MP (2005). Alleles In Space: Computer software for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. *J Hered* 96:722-724.
- Monsen KJ, Blouin MS (2004) Extreme isolation by distance in a montane frog *Rana cascadae*. *Conservation Genetics* 5:827–835.
- Nair A, Gopalan S V., George S, et al. (2012) Genetic variation and differentiation in *Indirana beddomii* frogs endemic to the Western Ghats biodiversity hotspot. *Conservation Genetics* 13:1459–1467.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945–959.
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43:223–225.
- Rosenberg NA (2004) Distruct: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes* 4:137-138.
- Rousset P (2008) Genepop'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8:103-106.
- Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18:233-234.
- Slatkin M (1987) Gene Flow and the Geographic Structure of Natural Populations. *Science* 236:789–792.
- 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.

Tomazelli LJ, Villwock JA (2000) O Cenozóico no Rio Grande do Sul: Geologia da Planície Costeira. In: Holz M, de Ros LF (Eds) *Geologia do Rio Grande do Sul*. Editora Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, pp 375-406.

Tomazelli LJ, Villwock JA (2005) Mapeamento Geológico de Planícies Costeiras: o Exemplo da Costa do Rio Grande do Sul. *Gravel* 3:109–115.

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

TABLES

Table 1. Localities sampled, respective abbreviation of the populations and number of individuals collected in each site. Microsatellite diversity are shown with mean values of alleles (A), observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosity as also departures from Hardy-Weinberg equilibrium (HWED - after Bonferroni correction) and inbreeding coefficient (F_{IS}) for all populations.

Location	Population	<i>n</i>	A	H_o	H_e	HWED	F_{IS}
Mar Grosso , Laguna (SC)	GRO	6	5.00	0.5625	0.7102	Medo2	0.22414*
Ipuã, Laguna (SC)	IPU	8	4.56	0.4722	0.6741	Medo6	0.31412*
Farol de Santa Marta, Laguna (SC)	FSM	9	4.11	0.4938	0.6108	-	0.20100*
Ilhas, Araranguá (SC)	ILH	4	3.89	0.5278	0.7024	Medo6	0.27848
Morro dos Conventos, Araranguá (SC)	CON	10	5.67	0.5556	0.6883	Medo8	0.20142*
Passo de Torres (SC)	PAT	3	3.44	0.5185	0.7037	-	0.30864
Guarita, Torres (RS)	GUA	5	4.11	0.6444	0.7284	-	0.12782
Itapeva, Torres (RS)	ITA	3	3.33	0.5556	0.7333	-	0.28571
Arambaré (RS)	ARA	20	6.44	0.5360	0.6920	Medo1; Medo3	0.23095*
Ilha dos Marinheiros, Rio Grande (RS)	MAR	15	4.67	0.5852	0.6508	Medo2	0.10409

*significant values after Bonferroni correction ($p < 0.006$)

Table 2: Pairwise F_{ST} (under diagonal) and R_{ST} (above diagonal) among populations. Significant values after Bonferroni correction are in bold.

	RST										
FST	GRO	IPU	FSM	ILH	CON	PAT	GUA	ITA	ARA	MAR	
GRO	-	0.01098	0.03812	-0.06588	-0.02604	0.10099	0.00824	-0.12250	0.13156	0.04792	
IPU	0.12460	-	-0.04173	-0.01273	0.01107	0.15602	0.09948	-0.04557	0.08375	0.06491	
FSM	0.12591	0.01393	-	0.02485	0.06741	0.20665	0.14531	-0.02124	0.10719	0.09544	
ILH	0.14454	0.04633	0.07748	-	-0.02866	0.12415	0.02638	-0.11914	0.10388	0.11453	
CON	0.09917	0.07091	0.10314	0.07901	-	0.04096	-0.00152	-0.04370	0.16030	0.04365	
PAT	0.12499	0.05641	0.10548	0.05390	0.05123	-	-0.03510	0.11028	0.28851	0.05556	
GUA	0.13284	0.08822	0.12999	0.07303	0.02985	0.03443	-	0.00596	0.27124	0.06448	
ITA	0.10006	0.15334	0.16504	0.10999	0.09410	0.09062	0.00361	-	0.04155	0.04038	
ARA	0.11634	0.14876	0.12383	0.12539	0.12466	0.14344	0.12280	0.03604	-	0.19178	
MAR	0.17458	0.16041	0.20132	0.14330	0.15534	0.15029	0.12673	0.13942	0.18850	-	

Table 3. Probability for the 10 localities sampled to belong to each cluster when K=4 inferred by the program Structure.

Given Pop	Inferred Clusters			
	1	2	3	4
1 – GRO	0.056	0.361	0.024	0.559
2 – IPU	0.061	0.009	0.014	0.916
3 – FSM	0.011	0.023	0.004	0.962
4 – ILH	0.302	0.042	0.123	0.533
5 – CON	0.816	0.031	0.012	0.141
6 – PAT	0.544	0.035	0.027	0.394
7 – GUA	0.817	0.034	0.070	0.079
8 – ITA	0.398	0.554	0.023	0.025
9 – ARA	0.013	0.966	0.006	0.015
10 – MAR	0.008	0.004	0.977	0.011

Table 4. AMOVA comparisons for two different hypothetical subdivisions, considering distances as separators, and hypothetical barriers to gene flow.

Source of variation	Distances	Barriers and distances
Among Groups (FCT)	6.78% (0.07*)	10.16% (0.10**)
Among populations within groups (FSC)	6.57% (0.07**)	3.24% (0.04)
Within populations (FST)	86.65% (0.13**)	86.60% (0.13**)

* $p < 0.01$

** $p < 0.001$

FIGURES

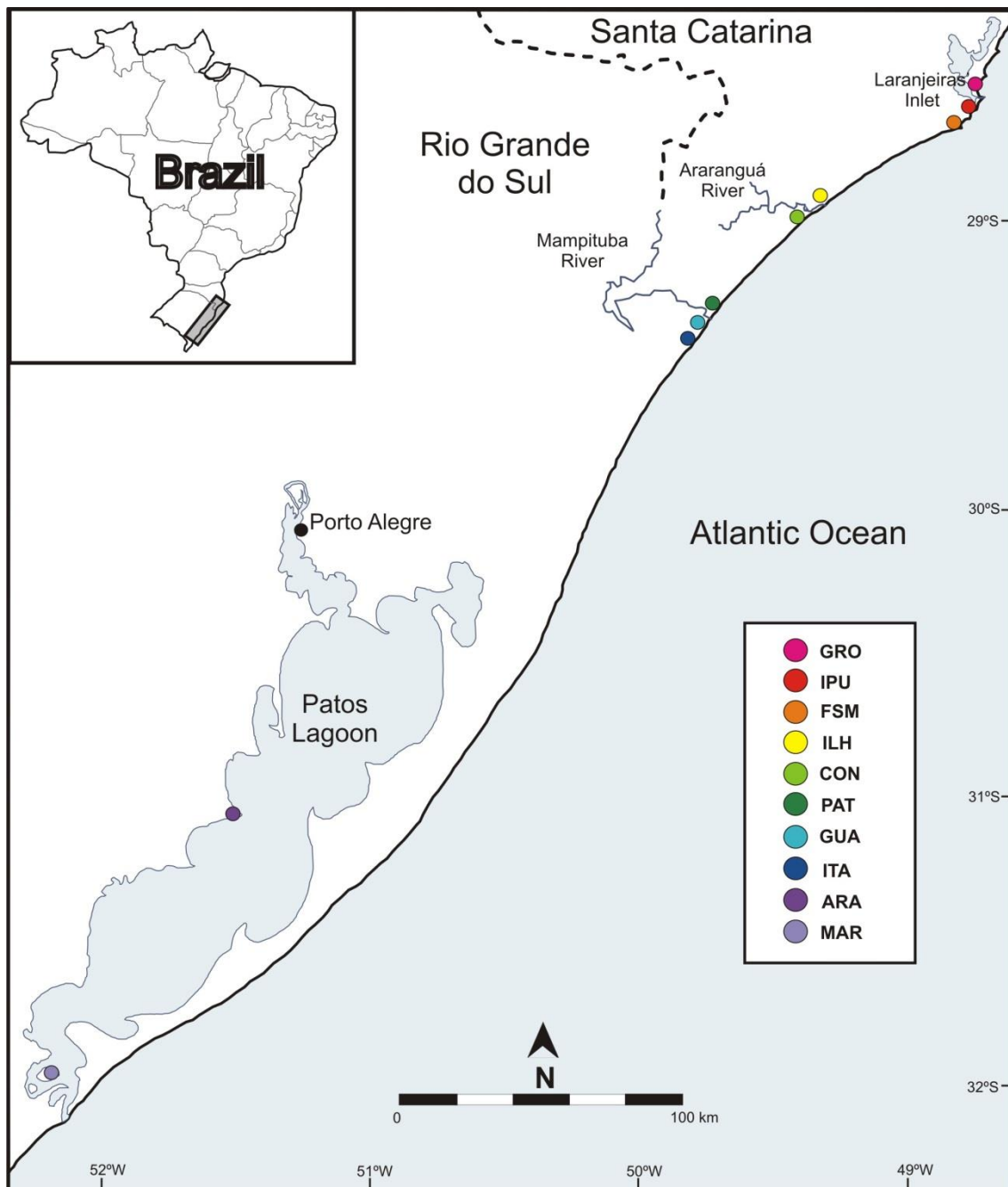


Figure 1. Map of coastal line from Rio Grande do Sul and Santa Catarina states, southern Brazil, and sampling locations throughout species distribution. Possible barriers indicated on map from north to south are: Laguna's Inlet, Araranguá and Mampituba River.

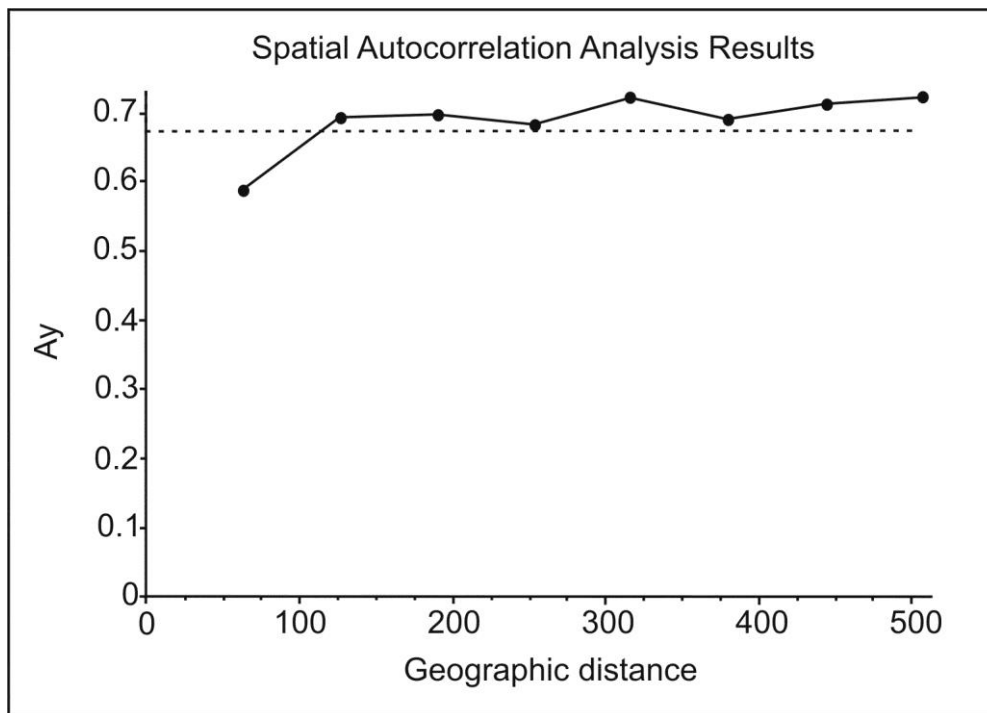


Figure 2. Spatial autocorrelation between genetic difference and geographic distance, in km.

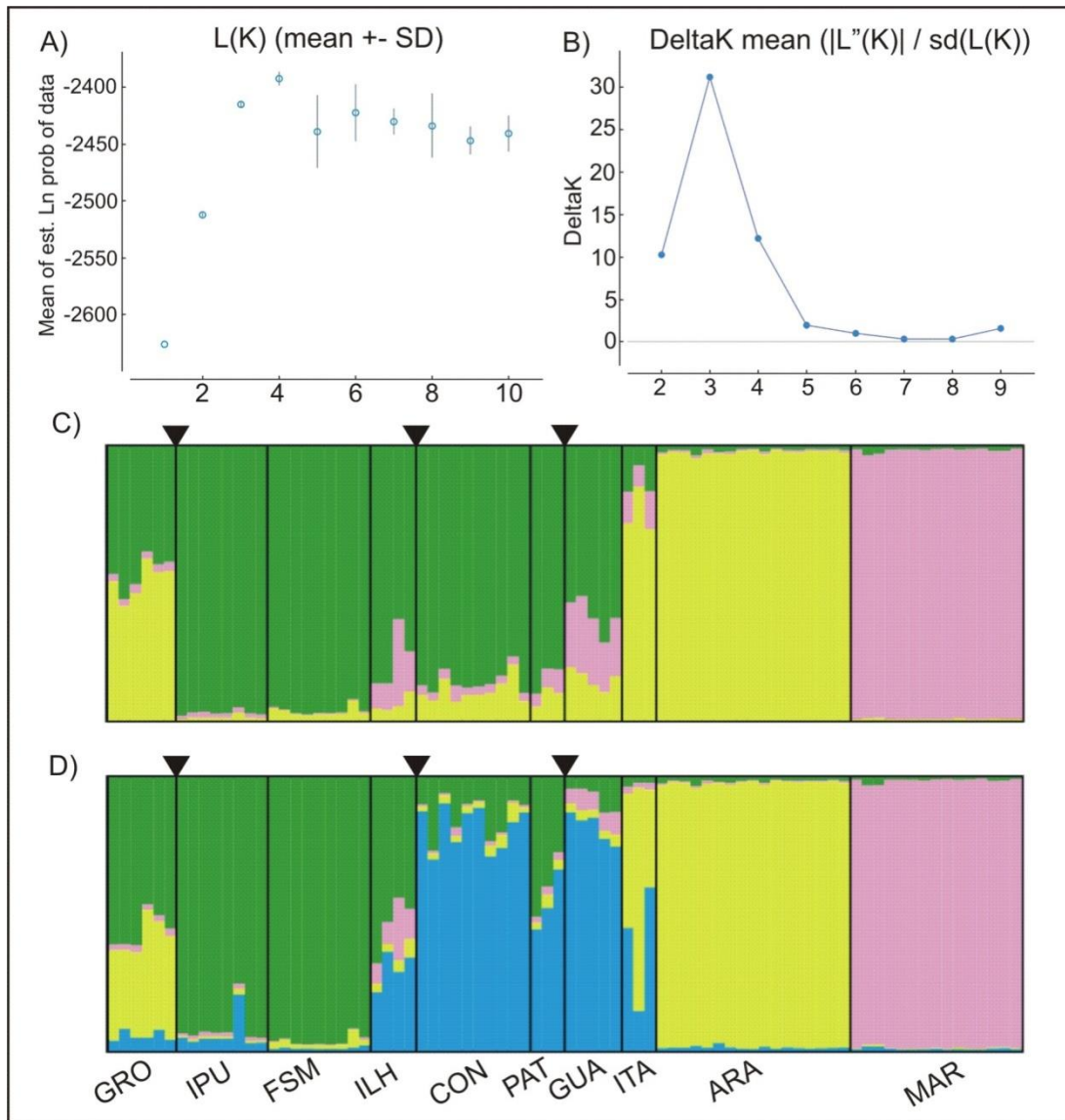


Figure 3. Best K inferred by the highest mean value of probability (A) and best K considering Delta K (B). Population structure across distribution, ordered from north to south when $k=3$ (C), and $K=4$ (B) with population information a priori. Triangles indicate, from left to right: Laguna's Inlet, Araranguá River and Mampituba River.

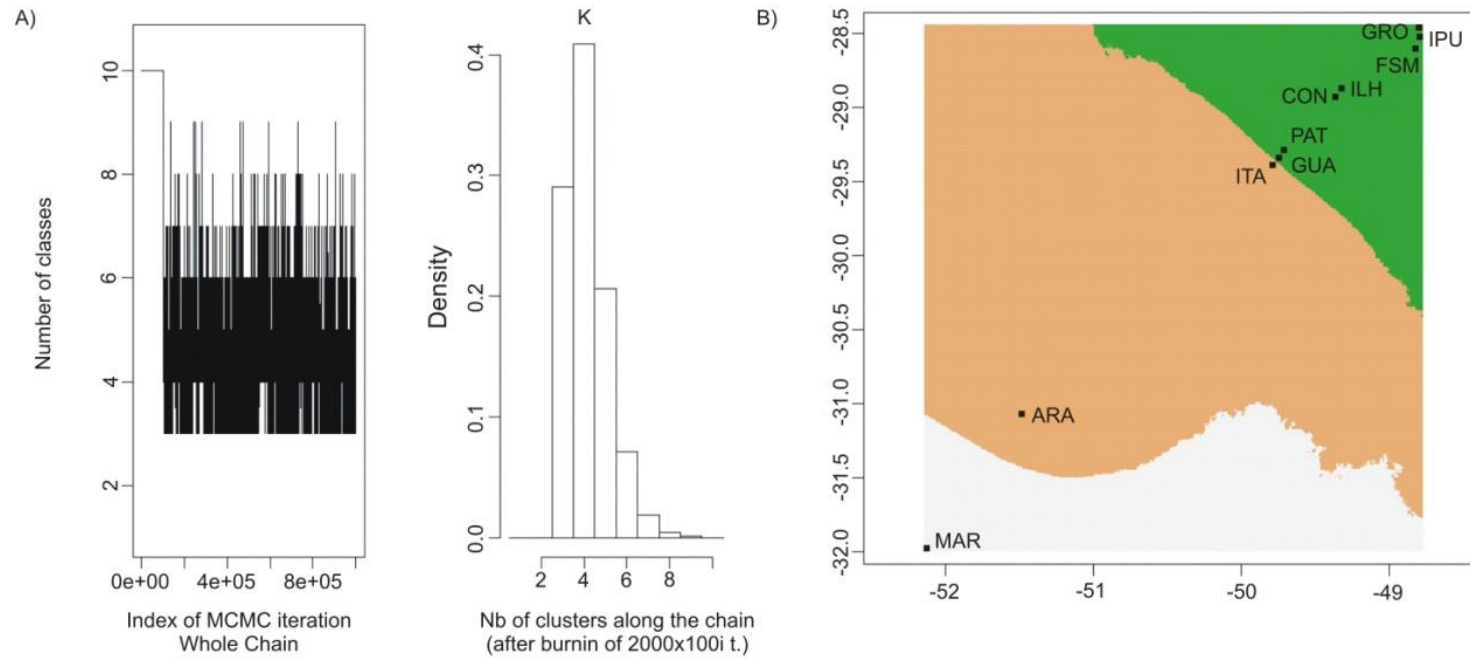


Figure 4. Number of clusters inferred (A) and populations assignment to each cluster ($K=3$, B) in Geneland.

DISCUSSÃO GERAL

Neste estudo foi verificada a variabilidade e estruturação genética de populações de *Melanophryniscus dorsalis*. Para isso este trabalho foi dividido em dois capítulos. O primeiro tratou do desenvolvimento de marcadores de microssatélites e descrição de *primers* que permitissem a aplicação nas populações da espécie. O segundo, então, tratou do uso dos marcadores desenvolvidos no primeiro capítulo em amostras de *M. dorsalis* presentes no Laboratório de Citogenética e Evolução (UFRGS).

Os dados obtidos foram apresentados e discutidos de forma independente em cada um dos capítulos apresentados e a seguir serão mostrados os principais pontos discutidos ao longo do trabalho.

Nove, dos vinte e sete *loci* encontrados apresentaram amplificação reprodutível, confiável e se mostraram polimórficos, ou seja, com mais de um alelo presente nas amostras. Para a descrição da variabilidade dos microssatélites encontrados, foram utilizadas duas populações que apresentavam o maior número amostral: Arambaré (20) e Ilha dos Marinheiros (15). Três *loci*, dois em Arambaré e um em Ilha dos Marinheiros apresentaram desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg e a presença de alelos nulos. Como o padrão não foi verificado nas duas populações para o mesmo *locus* e em outras populações posteriormente analisadas, esse desvio pode ter sido causado por um viés na amostragem, uma população efetiva pequena das localidades avaliadas e efeitos da deriva genética nas populações. Essa espécie tem por hábito a reprodução explosiva após grandes precipitações, onde muitos indivíduos se juntam em poças temporárias ou nas margens de lagoas (Kwet *et al.*, 2005). No caso específico de Arambaré, os indivíduos foram coletados num desses momentos de reprodução explosiva, podendo ter levado migrantes de diferentes populações próximas para a mesma poça d'água, ocasionando um possível efeito Wahlund.

No segundo capítulo, os nove microssatélites desenvolvidos foram aplicados em dez populações, localizadas principalmente no norte da distribuição da espécie, no estado de Santa Catarina e município de Torres. Além desta última, mais duas localidades do Rio Grande do sul foram representadas neste trabalho. Arambaré, na costa interna da Lagoa dos Patos,

e Ilha dos Marinheiros, na foz da Lagoa dos Patos, extremo sul da distribuição. É importante ressaltar a falta de amostragem ao longo do litoral do Rio Grande do Sul. Atualmente, há apenas registros históricos na maior parte dessa região, que é altamente impactada pela atividade humana. Acredita-se que essa espécie tenha sofrido grandes declínios populacionais e/ou extinções locais, principalmente no litoral norte do RS. Como levantado por Bernardo-Silva *et al.* (2012) a falta de registros recentes nesta localidade, no entanto, não invalida a presença da espécie, pois a localização de indivíduos é difícil, sendo mais facilmente avistados durante chuvas intensas onde ocorre a explosão reprodutiva.

Assim como no primeiro capítulo, alguns loci se encontraram fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg, e igualmente a presença de alelos nulos. Novamente, por se tratar de *locus* diferente para cada população, a falta de equilíbrio se deve aos mesmos motivos creditados anteriormente. Amostragem insuficiente, populações pequenas, efeito de deriva, comportamento de reprodução explosiva, acasalamento não panmítico, levando a um não cumprimento das premissas estabelecidas no teste.

A diversidade genética, demonstrada pela heterozigosidade observada média foi alta. As localidades apresentaram um fluxo gênico moderado entre si, e um número aproximado de 2 migrantes entre as populações. As análises bayesianas demonstraram uma estruturação das populações e o teste de mantel mostrou uma correlação significativa entre as distâncias genética e geográfica, indicando um isolamento por distância para a espécie. A análise de autocorrelação espacial também indicou uma correlação positiva entre distância genética e geográfica até aproximadamente 100 km, quando o máximo de diferenciação genética é atingido. Este isolamento é concordante com a baixa dispersão encontrada na maioria das espécies de anfíbios (Green e Smith, 2005). O tamanho diminuto dos indivíduos dessa espécie (1-2 cm) tende a colaborar com a baixa dispersão, e a distribuição linear de *M. dorsalis* facilita o fluxo gênico entre localidades próximas, se tornando mais fraco a medida que elas se tornam mais distantes. Isolamento por distância também foi observado em espécies de roedores subterrâneos com distribuição similar e linear como *Ctenomys minutus* e *C. flamarioni* (Lopes *et al.*, 2013; Fernández-Stolz, 2007), bem como em outras espécies de anfíbios em diferentes habitats

(Monsen e Blouin, 2004; Nair *et al.*, 2012; Knopp e Merilä, 2009; Hale *et al.*, 2012).

Durante o segundo capítulo, também foi proposta a avaliação de rios e canais de água como possíveis barreiras ao fluxo gênico. Indivíduos de *M. dorsalis* são observados nadando em poças e pequenos lagos, onde se reproduzem, porém não se sabe se tal comportamento também acontece em rios, onde há maior fluxo e correnteza, bem como uma mistura de águas doce e marinha nas respectivas fozes. Para isso, foram coletadas amostras distantes de 5-10 km entre si, de cada lado da margem no Canal de Laguna, na cidade de Laguna, e dos Rios Araranguá e Mampituba (em Araranguá e Torres, respectivamente). Cada corpo d'água testado apresenta uma largura diferente, desde 250 m de distância entre as margens no Canal de Laguna, até 100 a 150 m no Rio Mampituba.

Através da análise de AMOVA foi possível observar uma estruturação das populações influenciadas pelos rios e canal testados, com valor significativo de F_{CT} . Uma leve quebra nos clusters formados no programa Structure também possibilitou observar a atuação dos corpos d'água. Aparentemente, a barreira que se mostrou mais efetiva em limitar o fluxo gênico foi o Canal de Laguna, no extremo da distribuição norte da espécie. O que demonstra que a simples presença de um canal pode não ser limitante para o fluxo de indivíduos, porém a partir de certa distância entre margens o canal se torna uma barreira. O Canal de Laguna faz a conexão do maior complexo lagunar de Santa Catarina com o mar, e tem distância média entre as margens de 250 m. Por se tratar de uma laguna, a água encontrada neste canal apresenta uma variação na salinidade de acordo com o aporte de água marinha e doce provinda dos rios para dentro das lagoas. A eficiência da barreira também pode ser verificada através dos valores moderados e significativos de F_{ST} encontrados entre a população de Mar Grosso (GRO) e demais populações ao sul do canal.

Para os rios analisados, não foi possível observar valores significativos de F_{ST} quando comparadas populações em cada lado das margens, possivelmente pela baixa amostragem das populações. Como os rios tem distância menor (150 a 200 m de largura para o Rio Araranguá e 100 a 150 m para o Rio Mampituba), a estruturação observada no resultado do Structure

também se mostra menor, quando $k=4$. Estes resultados mostram uma tendência da influência do tamanho da largura do rio na limitação do fluxo gênico. Quanto maior a distância entre as margens, menor o fluxo gênico. Alguns estudos demonstraram a eficiência nos rios como barreiras ao fluxo gênico para anfíbios (Alexandrino *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2009), enquanto que outros estudos também demonstraram a efetividade dos rios para diferenciação populacional em organismos maiores, tais como primatas (Eriksson *et al.*, 2004; Arora *et al.*, 2010). Mesmo assim, Buskirk (2012) realizou um estudo demonstrando que rios não alteram significativamente o fluxo gênico em duas espécies de anfíbios, enquanto que, estradas sim. Apesar de este estudo demonstrar certa estruturação causada pelas barreiras aqui analisadas, o mesmo não foi observado para o este grupo amostral quando analisado por marcadores mitocondriais (Bernardo-Silva, 2012). De fato, o DNA mitocondrial apresentou evidências de uma expansão recente através de testes de neutralidades e análise bayesiana de “skyline”, no qual demonstrou que esta expansão teve início por volta de 0,5 milhão de anos atrás (Bernardo-Silva, 2012). Esse início de expansão mostra uma relação com o início da formação da planície costeira, que ocorreu a partir de 400 mil anos até 5 mil anos atrás, através de eventos de transgressão-regressão do nível do mar (Tomazelli e Willcock, 2005). Lopes *et al.* (2013) acharam resultados similares para a espécie de roedor subterrâneo *C. minutus*, com microsatélites indicando estruturação de acordo com barreiras como rios, paleocanais e descontinuidades de habitat, enquanto que o DNA mitocondrial contou uma história e um compartilhamento de haplótipos diferentes, na mesma região de ocorrência do *M. dorsalis*. O DNA mitocondrial costuma refletir eventos históricos devido ao número populacional efetivo ser mais baixo, enquanto que, microsatélites são mais variáveis e mais propensos a homoplasias, e melhores para explicar eventos recentes. Ademais, a mudança nos cursos dos rios Araranguá e Mampituba no passado (Tomazelli e Willcock, 2000), pode ter levado a ausência de sinal de barreiras no DNA mitocondrial, permitindo que as populações analisadas permanecessem do lado da mesma margem, separando-as apenas recentemente. Os canais de Laguna e da Lagoa dos Patos (não analisado neste estudo), bem como a foz do Rio Mampituba, tiveram suas margens fixadas por ação humana nas últimas décadas.

Representantes políticos locais também discutem a fixação da foz do Rio Araranguá. Sendo assim, o sinal de tais barreiras pode aumentar ao longo das gerações, com o menor contato entre as populações, menor fluxo gênico e a deriva atuando independentemente em cada lado dos rios e/ou canais.

Apesar das populações de *M. dorsalis* terem mostrado uma diversidade alta, as populações de Mar Grosso, Ipuã, Farol de Santa Marta, Morro dos Conventos e Arambaré apresentaram valores significativos de F_{IS} , ou seja, um indicativo de ocorrência de endogamia. As demais populações não apresentaram valores significativos de F_{IS} , porém estes valores foram próximos do limite de significância. A alta endogamia pode levar ao aumento da mortalidade de larvas e seus efeitos são menos severos em ambientes conservados (Andersen *et al.*, 2004). Portanto, os valores similares de endogamia encontrados neste estudo com os de Andersen *et al.* (2004) pode representar uma desvantagem para as populações, principalmente aquelas que se encontram em ambientes alterados. Mesmo assim, é importante ressaltar que estes valores de endogamia podem ser um caráter próprio da espécie. Reprodução explosiva em períodos curtos podem causar uma distorção, através da redução da população efetiva e endogamia em populações isoladas (Dixo *et al.*, 2009).

Mesmo com uma alta endogamia e um habitat bastante fragmentado, as três populações testadas para gargalos de garrafa não mostraram valores significativos nos testes, com exceção da população de Ilha dos Marinheiros, que apresentou excesso de heterozigiosidade apenas no modelo TPM (*two-phase mutation model*). Essa população encontra-se numa ilha e, portanto, possui certo isolamento de demais populações vizinhas, sendo mais suscetível a efeitos da deriva e flutuações populacionais e/ou um efeito fundador.

É importante destacar que, mesmo as populações não mostrando um gargalo de garrafa, o habitat vem sendo continuamente degradado devido a urbanização e ocupação humana (Esteves *et al.*, 2003), principalmente no litoral norte do RS. Esses fatores podem levar a um isolamento das populações e aumentar o risco de extinções locais. Em regiões do RS, só há registros históricos da espécie e acredita-se que nessas regiões, houve uma redução populacional, ou até mesmo extinção local da espécie. Isso favoreceria ainda mais ao isolamento das populações do sul.

Pela estruturação das populações ao longo da distribuição de *M. dorsalis*, é recomendável que elas sejam tratadas como diferentes unidades de manejo de acordo com os agrupamentos formados nas análises bayesianas, levando também em consideração estudos anteriores (Bernardo-Silva *et al.*, 2012; Bernardo-Silva, 2012). Como já sugerido por Bernardo-Silva *et al.* (2012) é importante a criação de mais unidades de conservação ao longo da distribuição da espécie. Atualmente, há apenas dois parques estaduais no Rio Grande do Sul que englobam a área de ocorrência de *M. dorsalis*, sendo eles o Parque Estadual de Itapeva e da Guarita, ambos localizados no município de Torres. A criação de mais áreas de preservação em diferentes pontos da distribuição facilitaria a conservação da espécie e o fluxo gênico entre populações, evitando o isolamento destas e um aumento na endogamia, levando aos problemas já comentados anteriormente. No estado de SC existe a Área de Preservação Ambiental Baleia Franca, mas esta abrange apenas espécies marinhas. Como discutido no capítulo II, bem como por Bernardo-Silva *et al.* (2012), Morro dos Conventos seria uma área propícia para a criação de uma nova unidade de conservação pela adequabilidade ambiental para a espécie. Do ponto de vista genético, esta área está no centro da distribuição da espécie em Santa Catarina e, portanto, seria importante para o contínuo fluxo gênico destas populações. As medidas conservacionistas geradas a partir de informações presentes neste trabalho não beneficiariam apenas a espécie aqui estudada, mas também outras igualmente ameaçadas que partilham distribuição semelhante como o tuco-tuco das dunas, *C. flamarioni* e o lagartinho das dunas, *Liolaemus occipitalis* (IUCN 2013).

REFERÊNCIAS

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2008) *Biologia molecular da célula*. Garland Science, New York.
- Alexandrino J, Froufe E, Arntzen JW, Ferrand N (2000) Genetic subdivision, glacial refugia and postglacial recolonization in the golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica* (Amphibia: Urodela). *Molecular Ecology* 9:771–781.
- Allendorf FW, Luikart G (2007) *Conservation and the genetics of populations*. Blackwell, London.
- AmphibiaWeb (2014) *Amphibiaweb: Information on amphibian biology and conservation*. Berkeley, California: AmphibiaWeb. <http://amphibiaweb.org/>. Acessado: Fevereiro, 2014.
- Arora N, Nater A, Van Schaik CP, et al. (2010) Effects of Pleistocene glaciations and rivers on the population structure of Bornean orangutans (*Pongo pygmaeus*). *Proc Natl Acad Sci USA* 107:21376–81
- Baldo D, Basso NG (2004) A New Species of *Melanophryniscus* Gallardo, 1961 (Anura : Bufonidae), with Comments on the Species of the Genus Reported for Misiones, Northeastern Argentina. *Journal of Herpetology* 38:393–403.
- Bernardo-Silva JS (2012). História evolutiva e conservação de duas espécies de sapinho-da-barriga-vermelha *Melanophryniscus dorsalis* e *Melanophryniscus montevidensis*. Thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Bernardo-Silva J, Martins-Ferreira C, Maneyro R, Freitas TRO de (2012) Identification of Priority Areas for Conservation of Two Endangered Parapatric Species of Red-bellied Toads Using Ecological Niche Models and Hotspot Analysis. *Brazilian Journal of Nature Conservation* 10:207–213.
- Buskirk J (2012) Permeability of the landscape matrix between amphibian breeding sites. *Ecology and Evolution* 2:3160–7.

CONSELHO ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE – CONSEMA. Reconhece a Lista Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção no Estado de Santa Catarina e dá outras providências. Resolução n. 002, de 6 de dezembro de 2011. www.fatma.sc.gov.br. Acessado em dezembro 2013.

Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144:2001-2014.

Crawford AJ, Bermingham E, Polanía C (2007) The role of tropical dry forest as a long-term barrier to dispersal: a comparative phylogeographical analysis of dry forest tolerant and intolerant frogs. *Molecular Ecology* 16:4789–4807.

Crawford AJ, Lips KR, Bermingham E (2010) Epidemic disease decimates amphibian abundance, species diversity, and evolutionary history in the highlands of central Panama. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:13777–82.

Cruz CAG, Caramaschi U (2003) Taxonomic status of *Melanophryniscus stelzneri dorsalis* (MERTENS, 1933) and *Melanophryniscus stelzneri fulvoguttatus* (MERTENS, 1937) (Amphibia, Anura, Bufonidae). *Boletim do Museu Nacional* 500:1–11.

Di Rienzo A, Peterson AC, Garza JC, Valdes AM, Slatkin M, Freimer NB (1994) Mutational processes of simple sequence repeat loci in human populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:3166-3170.

Doyle JJ, Doyle, JL (1987) A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 9(1):11-15.

Earl DA, vonHoldt BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4(2):359-361.

Eriksson J, Hohmann G, Boesch C, Vigilant L (2004) Rivers influence the population genetic structure of bonobos (*Pan paniscus*). *Molecular Ecology* 13:3425–35

- Esteves LS, Ernestino E, Jr T, Dillenburg SR (2002) Long- and Short-Term Coastal Erosion in Southern Brazil. *Journal of Coastal Research* 36:273–282.
- Esteves LS, Silva ARP, Arejano TB, Pivel MAG, Vranjac MP (2003) Coastal development and human impacts along the Rio Grande do Sul beaches, Brazil. *Journal of Coastal Research* 35:548-556.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14(8):2611–20.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics* 1:47-50.
- Excoffier L, Heckel G (2006) Computer programs for population genetics data analysis: a survival guide. *Nature Reviews Genetics* 7:745–58.
- Ferreira ME, Grattapaglia D (1998) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2ª ed. Embrapa Cenargen, Brasília, DF. 220 pp.
- Fernández-Stolz, GP (2007). Estudos evolutivos, filogeográficos e de conservação em uma espécie endêmica do ecossistema de dunas costeiras do sul do Brasil, *Ctenomys flamarioni* (Rodentia - Ctenomyidae), através de marcadores microssatélites e DNA mitocondrial. Thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 193 p.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press.
- Frost DR, Grant T, Faivovich J, et al. (2006) The amphibian tree of life. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 297:370.
- Frost DR (2014) Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0 (Fevereiro, 2014). Electronic Database. American Museum of Natural

History, New York, USA. <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. Acessado: Fevereiro, 2014.

Garcia PCA, Vinciprova G (2003) Anfíbios In: *Livro Vermelho da fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul*. pp 147-164.

Garraffo HM, Andriamaharavo NR, Vaira M, et al. (2012) Alkaloids from single skins of the Argentinian toad *Melanophryniscus rubriventris* (ANURA, BUFONIDAE): An unexpected variability in alkaloid profiles and a profusion of new structures. *SpringerPlus* 1:51.

Grant T, Colombo P, Verrastro L, Saporito RA (2012) The occurrence of defensive alkaloids in non-integumentary tissues of the Brazilian red-belly toad *Melanophryniscus simplex* (Bufonidae). *Chemoecology* 22:169–178.

Graybeal A, Cannatella DC (1995) A new taxon of bufonidae from Peru, with descriptions of two new species and a review of the phylogenetic status of supraspecific bufonid taxa. *Herpetologica* 51:105–131.

Green DM (2003) The ecology of extinction: population fluctuation and decline in amphibians. *Biology Conservation* 111:331-343.

Guillot G, Estoup A, Mortier F, Cosson JF (2005) A spatial statistical model for landscape genetics. *Genetics* 170:1261–80.

Guillot G, Santos F, Estoup A (2008) Analysing georeferenced population genetics data with Geneland: a new algorithm to deal with null alleles and a friendly graphical user interface. *Bioinformatics* 24(11):1406-1407.

Haddad CFB (2008) Anfíbios. In: *Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção*. Fundação Biodiversitas, Brasília, pp 286-325.

Hale JM, Heard GW, Smith KL, et al. (2012) Structure and fragmentation of growling grass frog metapopulations. *Conservation Genetics* 14:313–322.

Handley LJJ, Perrin N (2007) Advances in our understanding of mammalian sex-biased dispersal. *Molecular Ecology* 16:1559–78.

- Hewitt G (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405:907–13.
- Horn NOF (2003) Setorização da Província Costeira de Santa Catarina em base aos aspectos geológicos, geomorfológicos e geográficos. *Geosul* 18:71–98.
- Hubisz MJ, Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2009) Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources* 1322-1332.
- International Union for Conservation of Nature – IUCN (2013) IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.2. www.iucnredlist.org. Acessado: Fevereiro 2014.
- Jakobsson M, Rosenberg NA (2007) CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23:1801–1806.
- Jarne P, Lagoda PJ (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology & Evolution* 11:424–9.
- Kimura M, Ohta T (1978) Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proc Natl Acad Sci* 75:2868-2872
- Knopp T, Merilä J (2009) Microsatellite variation and population structure of the moor frog (*Rana arvalis*) in Scandinavia. *Molecular Ecology* 18:2996–3005.
- Kwet A, Maneyro R, Zillikens A, Mebs D (2005) Advertisement calls of *Melanophryniscus dorsalis* (Mertens, 1933) and *M. montevidensis* (Philippi, 1902), two parapatric species from southern Brazil and Uruguay, with comments on morphological variation in the *Melanophryniscus stelzneri* group (Anura: Bufonidae). *SALAMANDRA* 41:3–20.
- Langone JA (1994) Ranas y sapos del Uruguay. *Museo Damaso Antonio Larrañaga* 5:124.

- Li R, Chen W, Tu L, Fu J (2009) Rivers as barriers for high elevation amphibians: a phylogeographic analysis of the alpine stream frog of the Hengduan Mountains. *Journal of Zoology* 277:309–316.
- Lopes CM, Ximenes SSF, Gava A, Freitas TRO (2013) The role of chromosomal rearrangements and geographical barriers in the divergence of lineages in a South American subterranean rodent (Rodentia: Ctenomyidae: *Ctenomys minutus*). *Heredity* 111:293-305.
- Ljungqvist M, Mikael A, Hansson B (2010) Do microsatellites reflect genome-wide genetic diversity in natural populations? *Molecular Ecology* 19:851–855.
- Mebis D, Pogoda W, Maneyro R, Kwet A (2005) Studies on the poisonous skin secretion of individual red bellied toads, *Melanophryniscus montevidensis* (Anura, Bufonidae), from Uruguay. *Toxicon* 46:641–650.
- Mebis D, Maneyro R, Pogoda W (2007) Further studies on pumiliotoxin 251D and hydroquinone content of the skin secretion of *Melanophryniscus* species (Anura, Bufonidae) from Uruguay. *Toxicon* 50:166–169.
- Mertens R (1933) Über zwei südamerikanische Froschlurche der Gattungen *Dendrophryniscus* und *Gastrotheca*. *Zool Anz* 102:257-260.
- Miller MP (2005). Alleles In Space: Computer software for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. *J Hered* 96:722-724.
- Monsen KJ, Blouin MS (2004) Extreme isolation by distance in a montane frog *Rana cascadae*. *Conservation Genetics* 5:827–835.
- Nair A, Gopalan S V., George S, et al. (2012) Genetic variation and differentiation in *Indirana beddomii* frogs endemic to the Western Ghats biodiversity hotspot. *Conservation Genetics* 13:1459–1467.
- Pough FH, Janis CM, Heiser, JB (2008) Salamandras, anuros e cecílias. In: A vida dos vertebrados. 4. ed. São Paulo: Atheneu. pp. 220-263.

- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945–959.
- Pyron RA, Wiens JJ (2011) A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 61:543–83.
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43:223–225.
- Rosenberg NA (2004) Distruct: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes* 4:137-138.
- Rousset P (2008) Genepop'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8:103-106.
- Rozen, S Skaletsky, HJ (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386
- Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18:233-234.
- Slatkin M (1987) Gene Flow and the Geographic Structure of Natural Populations. *Science* 236:789–792.
- Schlötterer C (1998) Microsatellites. In: Hoelzel, AR (ed.) *Molecular genetic analysis of populations. A practical approach*. Oxford: IRL Press.
- Smith MA, Green DM (2005) Dispersal and the metapopulation paradigm in amphibian ecology and conservation: are all amphibian populations metapopulations? *Ecography* 28:110–128.
- 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.

- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28:2731-2739.
- Temnykh S, Lukashova A, Cartinhour S, DeClerck G, Lipovich L, McCouch S (2001) Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic potential. *Genome Research* 11:1441-1452.
- Tomazelli LJ, Dillenburg SR, Villwock JA (2000) Late Quaternary Geological History of Rio Grande do Sul Coastal Plain, Southern Brazil. *Revista Brasileira de Geociências* 30:474–476.
- Tomazelli LJ, Villwock JA (2000) O Cenozóico no Rio Grande do Sul: Geologia da Planície Costeira. In: Holz M, de Ros LF (Eds) *Geologia do Rio Grande do Sul*. Editora Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, pp 375-406.
- Tomazelli LJ, Villwock JA (2005) Mapeamento Geológico de Planícies Costeiras: o Exemplo da Costa do Rio Grande do Sul. *Gravel* 3:109–115.
- vanOosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM et al (2004) MICROCHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4:535-538.
- Zane L, Bargelloni L, Patarnello T (2002) Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11:1-16.