

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DOUTORADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS

**ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL DE *Physalaemus cuvieri*  
FITZINGER, 1826 (ANURA: LEPTODACTYLIDAE) E PADRÕES DE  
OCUPAÇÃO HUMANA NO ESTADO DE GOIÁS**

*Mariana Pires de Campos Telles*

Goiânia-GO  
2005

Mariana Pires de Campos Telles

**ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL DE *Physalaemus cuvieri*  
FITZINGER, 1826 (ANURA: LEPTODACTYLIDAE) E PADRÕES DE  
OCUPAÇÃO HUMANA NO ESTADO DE GOIÁS**

Orientador: *Rogério Pereira Bastos*

Tese apresentada ao Programa de Doutorado em Ciências Ambientais da Universidade Federal de Goiás como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Ambientais.

Goiânia-GO  
2005

### **Dedicatória**

Aos meus Avós maternos (*Maria das Graças e Romeu*)

Aos meus Avós paternos (*Auristela e Olavo*)

Às minhas lindinhas (*Ana Clara e Anabela*)

## AGRADECIMENTOS

A parte mais difícil de escrever da Tese foi o agradecimento, pois é muito complicado traduzir em palavras sentimentos tão fortes. Mas vamos lá...

De uma maneira geral gostaria de agradecer todas as pessoas que de alguma forma participaram de alguma das etapas para a realização deste trabalho. Acredito que qualquer trabalho científico só se realiza com a dedicação de um grupo de pessoas, e este não foi diferente.

Em casa sempre tive um apoio incondicional do meu amor, José Alexandre, um super companheiro de todas as horas que sempre esteve ao meu lado, inclusive nos momentos mais difíceis... Gostaria de agradecê-lo pela insistência e pela confiança que depositou em mim quando me incentivou a participar da seleção neste programa de Doutorado, em uma época tão complicada, quando estávamos com a nossa primeira filhinha (Ana Clara) com apenas dois meses de vida. Com certeza não teria nem começado se não fosse a certeza de poder contar com o seu apoio em casa, cuidando da Aninha, enquanto eu estava assistindo aulas! Quantas vezes senti vontade de parar por achar que não teria forças para a tripla jornada. Tantas noites em claro, cuidando da nossa Aninha, exauriam as minhas forças, mas ele sempre estava lá, me colocando pra frente e me ajudando no que podia durante as 24 horas do dia. Assim, acabei continuando... Como se não bastasse acabou “escapulindo” mais uma linda filhinha (Anabela), e mais uma vez precisei de muita força e apoio para conseguir conciliar com as atividades do Doutorado e do trabalho sem jamais deixar de exercer a minha principal função que é ser Mãe. Ufa! Como foi difícil... Gostaria de agradecer às minhas filhas Ana Clara, que hoje já está com três anos, e Anabela, com 1 aninho. Sei que involuntariamente e de maneiras diferentes elas me ajudaram muito a concluir mais esta etapa da minha vida, pois são elas que colocam meus pés no chão e que dão sentido para que tenha responsabilidade e disciplina, conseguindo administrar o meu tempo de maneira a conseguir concluir tudo o que começo, sem jamais deixar de dedicar-me a elas. Agradeço com um carinho especial a Babel por me permitir o prazer de ter a companhia de seus dois super filhos (João Vítor e João Pedro), os quais também considero como meus, que além de companheiros estão sempre dispostos a ajudar e constantemente estiveram presente, inclusive cuidando das irmãs e se privando de alguns passeios. MUITO OBRIGADA MESMO, EU AMO VOCÊS!

Agradeço de coração a todos os meus familiares, em especial meu querido Pai (Francisco de Assis), minhas Mães (Mariah e Cynthia), meus irmãos (Olavo e Heitor), minha cunhada (Jade) e meu lindo sobrinho (Pedro). Obrigada por compreender todas os momentos de ausência e por todo o apoio que sempre me deram. Minha querida Mãe eu gostaria de

agradecer de uma maneira especial pelo exemplo de vida que sempre me deu, por sempre acreditar e me fazer acreditar que sou capaz, além da constante força e estímulo para que pudesse realizar todas as minhas “invenções de moda”. VOCÊS SÃO MUITO ESPECIAIS!

O meu querido Prof. Roger, o qual me acompanha desde a graduação, eu agradeço de coração a possibilidade de realização deste trabalho que começou como um parceria e acabou se transformando em um trabalho de Tese, MUITO OBRIGADA PELA ORIENTAÇÃO!

Gostaria de agradecer meus dois 'braços-direitos', Thannya e Lucileide, sem as quais eu jamais teria conseguido sequer coletar os dados no laboratório e processá-los para que “virassem” 0's e 1's!!! Considero estas duas como minhas filhas, me lembro como se fosse hoje quando eram apenas duas menininhas... Hoje, já no mestrado, além de minhas companheiras de trabalho, se tornaram grandes amigas. Gostaria de fazer um agradecimento especial à "Tia Thannya" pelo apoio constante que tem dado também em casa, durante noites e noites, me ajudando a cuidar das Meninas. VOCES SÃO DEMAIS!

Um agradecimento, por todas as ausências, aos alunos de monografia e do Mestrado da UCG, Nicole, Beatriz, Christianne, Gabriela Loide, Lorena, Luciana e em especial a Cristiane, que fez o levantamento cienciométrico dos RAPD's. VALEU MOÇADA!

Não poderia me esquecer de um grupo muito importante coordenado pelo meu orientador, Dr. Rogério, das pessoas que foram responsáveis por toda a coleta de material biológica para que eu pudesse extrair o DNA e realizar todo o trabalho, em especial aos meus colegas Leôncio, Lorena e Rafael. VOCES FORAM ESSENCIAIS!

Agradeço todos os meus colegas de turma do CIAMB (Cleuler, Valter, Roberto, Cida, Cleiber, Marilda, Héliida, Neucirio, Ieda, Falconi, Cleber, Bernardo, Nardini, Harlem, 'Bill'), nos tornamos amigos e companheiros. Por participarmos da primeira turma, experimentamos momentos de muita descontração e alegria, mas também momentos de tensão, que foram resolvidos de maneira muito profissional fazendo com que corpo discente e docente crescessem juntos. Com um carinho muito especial agradeço à constante força dada pela minha colega de graduação, amiga e companheira de laboratório, Flávia Rodrigues. SENTIREI SAUDADES!

Aproveitando o ensejo, agradeço a todo o corpo docente e também ao Programa de Doutorado em Ciências Ambientais da UFG, nas pessoas do primeiro Coordenador, Dr. Leandro G. Oliveira, e do atual Dr. Nelson Antoniosi Filho, pela oportunidade. Um agradecimento especial ao Prof. Dr. José Alexandre, um verdadeiro Mestre que sempre incentiva e estimula os seus alunos, além de infectá-los com o vírus da produção científica; à Profa. Dra. Augustina Echeverria eu agradeço todos os momentos altamente esclarecedores que pudemos ter com as ferventes discussões sobre o que, de fato, podemos chamar de multi-

inter-transdisciplinaridade, acredito ter aprendido muito; ao Prof. Dr. Fausto Miziara gostaria de agradecer a oportunidade de ter contato com uma área tão diferente da minha formação básica, a sociologia, onde ele a apresentou de uma maneira muito interessante e empolgante, não só devido à sua competência mas também pela paixão pelo que faz, muito obrigada mesmo. Tentarei seguir o melhor de cada um de vocês durante a minha vida profissional. OBRIGADA!

Aos professores Dr. Luís Maurício Bini e Dr. Lázaro José Chaves eu gostaria de agradecer as sugestões e colaborações no exame de qualificação, que foram fundamentais para o aprimoramento da Tese. MUITÍSSIMO OBRIGADA

Gostaria de agradecer de coração meus colegas de trabalho do Departamento de Zootecnia da UCG, em especial a Maria Silvia, Ana Christina, Breno e Roberto Toledo pelo constante apoio e por me aturar com uma tensão constante, sempre estressada, durante todos estes anos. Todos os momentos de descontração foram fundamentais para que as minhas forças fossem restabelecidas. VOCES SÃO MUITO ESPECIAIS!

Ao pessoal do laboratório de Ecologia Teórica e Síntese, um agradecimento para lá de especial, principalmente ao Thiago Rangel pela disponibilização dos dados ambientais e sócio-econômicos, e à minha colega Tereza Cristina, pela confecção do mapa de distribuição da espécie. MUITO OBRIGADA!

Ao Prof. Dr. Laerte Ferreira, coordenador do LAPIG, agradeço a disponibilização dos mapas de remanescentes florestais do Cerrado e de áreas prioritárias apresentados no Workshop para definição de áreas prioritárias para conservação em Goiás, fundamentais para o embasamento das discussões deste trabalho. OBRIGADA!

Não poderia deixar de agradecer aos financiadores deste projeto, que foram o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico (CNPq, procs. No. 520804/99-6 e 465137/00-8) e o PRONEX um programa do CNPq / SECTEC-GO (proc. 23234156) que visa estabelecer áreas prioritárias para Cerrado. À Pro Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da UCG, em especial ao Dr. Nelson Jorge da Silva Júnior e ao Dr. José Nicolau Heck, que sempre me apoiaram no que foi possível, permitindo a realização deste trabalho. Ao Dr. Altair Sales, um agradecimento especial, pelo apoio sempre concedido e pelo fato de abrigar o Laboratório de Genética, que hoje se encontra no Instituto do Trópico Subúmido da UCG. MUITO OBRIGADA!

## SUMÁRIO

	Página
Lista de Figuras	8
Lista de Tabelas	11
RESUMO	12
ABSTRACT	14
INTRODUÇÃO	16
OBJETIVOS	21
REGIÃO DE ESTUDO	22
ESPÉCIE ESCOLHIDA	28
MATERIAL E MÉTODOS	33
<i>Obtenção de Dados Moleculares</i>	33
<i>Estimativa de Freqüências Alélicas e Parâmetros Genéticos Básicos</i>	35
<i>Estrutura Genética Populacional</i>	36
<i>Divergência Genética e Padrões Espaciais</i>	41
<i>Análise de descontinuidade genética</i>	44
<i>Associação do padrão espacial da variabilidade genética à história da ocupação humana na região do Cerrado</i>	46
<i>Definição de Unidades Operacionais para a conservação da variabilidade genética</i>	51
<i>Softwares utilizados nas análises</i>	52
RESULTADOS	53
<i>Análise de repetibilidade e seleção dos primers RAPD</i>	53
<i>Variabilidade genética dentro e entre populações</i>	57
<i>Padrões espaciais da divergência genética das populações</i>	66
<i>Correspondência entre Distâncias Genéticas e Dados Sócio-Econômicos e Ambientais</i>	70
DISCUSSÃO	77
<i>Estrutura populacional em <i>Physalaemus cuvieiri</i></i>	77
<i>Estratégias para a conservação da variabilidade genética</i>	82
CONCLUSÕES	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
APÊNDICES	107

## Lista de Figuras

	Página
<b>Figura 1.</b> Mapa com os Municípios do Estado de Goiás e a localização das áreas de coleta de <i>Physalaemus cuvieri</i> .	8
<b>Figura 2.</b> <i>Physalaemus cuvieri</i> Fitzinger, 1826 (Anura: Leptodactylidae).	14
<b>Figura 3.</b> Extensão de ocorrência de <i>Physalaemus cuvieri</i> (Base de dados do <i>Global Amphibian Assessment</i> , 2005).	15
<b>Figura 4.</b> Abundância mensal de <i>Physalaemus cuvieri</i> , entre junho de 1995 e maio de 1998, na Floresta Nacional, Silvânia, estado de Goiás.	16
<b>Figura 5.</b> Vocalizações de anúncio de indivíduo de <i>Physalaemus cuvieri</i> da Floresta Nacional, Silvânia, estado de Goiás. Temperatura do ar = 25°C. Temperatura da água = 27,5°C.	17
<b>Figura 6.</b> Desovas de <i>Physalaemus cuvieri</i> , na Floresta Nacional, Silvânia, Estado de Goiás.	17
<b>Figura 7.</b> Fragmentos RAPD amplificados dos <i>primers</i> OPH-4, OPH-5 e OPH-7 com três indivíduos de <i>Physalaemus cuvieri</i> . As colunas “M 100bp” indicam o marcador de peso molecular (100 base pair ladder, Pharmacia). Estão representados os limites superiores das intensidades de banda fraca e média e o limite inferior da intensidade forte.	19
<b>Figura 8.</b> Rede de Delaunay formando conexões entre as 18 populações de <i>P. cuvieri</i> estudadas.	33
<b>Figura 9.</b> Fragmentos RAPD amplificados dos <i>primers</i> OPC-08, OPC-09 e OPH-01 com três indivíduos de <i>Physalaemus cuvieri</i> . As colunas “M 100bp” indicam o marcador de peso molecular (100 <i>base pair ladder</i> , Pharmacia). Estão representadas as diferenças de intensidade na repetição de um determinado loco.	41
<b>Figura 10.</b> Distribuição de freqüência do rank da intensidade média por loco RAPD, em amostras de <i>physalaemus cuvieri</i> .	42
<b>Figura 11.</b> Freqüência dos locos RAPD considerando quatro classes de repetibilidade, 0 (não repetiu), 1 (repetiu apenas em um indivíduo), 2 (repetiu em dois indivíduos) e 3 (repetiu nos três indivíduos), em amostras de <i>physalaemus cuvieri</i> .	43
<b>Figura 12.</b> Correlação de Spearman entre a repetibilidade total e a intensidade média por loco RAPD, em amostras de <i>Physalaemus cuvieri</i> .	44
<b>Figura 13.</b> Distribuição de freqüência do número de <i>primers</i> em relação à correlação da repetibilidade total e a intensidade média por loco RAPD, em amostras de <i>Physalaemus cuvieri</i> .	44



- Figura 14.** Distribuição de frequência do número de *primers* em relação à proporção de locos RAPD que não repetem considerando cada *primer*, em amostras de *Physalaemus cuvieri*. 45
- Figura 15.** Distribuição espacial dos valores de heterozigose nas 18 populações de *Physalaemus cuvieri*. 48
- Figura 16.** Distribuição espacial dos valores de Proporção de Locos polimórficos nas 18 populações de *Physalaemus cuvieri*. 48
- Figura 17.** Distribuição espacial dos valores das Variâncias dentro das populações com base na AMOVA nas 18 populações de *Physalaemus cuvieri*. 49
- Figura 18.** Distribuição dos valores de  $\theta$  dos 126 locos analisados nas populações de *Physalaemus cuvieri*. 50
- Figura 19.** Distribuição *a posteriori* do  $\theta^B$ , aproximada para uma distribuição beta com os parâmetros  $\alpha = 378,5$  e  $\beta = 3280,7$ . 53
- Figura 20.** Padrão de divergência genética entre as 18 populações de *Physalaemus cuvieri*, definido pelo agrupamento por UPGMA, com base nas distâncias genéticas ( $\Phi_{ST}$ ). Correlação cofenética igual a 0,8. 54
- Figura 21.** Análise tri-dimensional mostrando a posição relative das 18 populações de *P.cuvieri* no espaço genético ( $\Phi_{ST}$ ) reduzido por uma análise de escalonamento multidimensional não métrico (NMDS). 55
- Figura 22.** Relação entre distância genética ( $\Phi_{ST}$ ) e distância geográfica ( $r = 0,140$  -  $P = 0,129$ , com 5000 permutações) entre 18 populações de *P. cuvieri*. 56
- Figura 23.** Correlograma de Mantel construído com base nas distâncias genéticas ( $\Phi_{ST}$ ) entre 18 populações de *P. cuvieri*, ao longo de cinco classes de distâncias geográficas. A linha tracejada mostra a correlação esperada sob a hipótese nula de ausência de padrão espacial. Os números indicam a probabilidade de erro tipo I obtida usando 5000 permutações pelo teste de Mantel, somente o coeficiente da primeira classe de distância foi significativo a um nível de 5%. 57
- Figura 24.** Resultado da análise de descontinuidade genética sobre a rede de Delaunay, com as linhas cheias indicando presença de barreiras. 60
- Figura 25.** Mapa dos Remanescentes Florestais no Estado de Goiás (SEMARH, 2004). 61
- Figura 26.** Relação entre Distância Genética, Ano médio de fundação dos Municípios e População Humana (2000), ao longo das conexões da rede de Delaunay. 63
- Figura 27.** (A) Mapa do ano de instalação dos municípios do Estado de Goiás e (B) Mapa da densidade demográfica nos municípios do Estado de Goiás em 2000 (PNUD, 2003). 64

- Figura 28.** Ausência de relação entre estimadores da estrutura populacional (estimados pelo  $F_{ST}$  ou estatísticas relacionadas) e a extensão espacial máxima (km), para 28 estudos de diferenciação populacional em anfíbios utilizando marcadores moleculares ( $r = 0,065$ ;  $P = 0,745$ ). 68
- Figura 29.** Áreas prioritárias para a conservação da biodiversidade em Goiás, em níveis variando de 1 (menor prioridade) a 4 (maior prioridade) . 72
- Figura 30.** Uma possibilidade para a definição de Unidades Operacionais Intraespecíficas definidas com base no correlograma multivariado. 73
- Figura 31.** Uma possibilidade para a definição de Unidades Operacionais Intraespecíficas definidas com base no correlograma multivariado, levando-se em conta a presença de descontinuidade. 74
- Figura 32.** Distribuição do número de locos representados com diferentes proporções no conjunto de populações locais utilizadas como unidades operacionais para a conservação. 75

## Lista de Tabelas

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1.</b> Localidades, coordenadas geográficas e número de indivíduos de <i>Physalaemus cuvieri</i> amostrados e mesoregiões do Estado de Goiás.	7
<b>Tabela 2.</b> Esperanças matemáticas dos quadrados médios [E(QM)] para populações (P), indivíduos dentro populações (I/P) e genes dentro de indivíduos (G/I) obtidas das análises de variância no modelo hierárquico desbalanceado, conforme Anderson & Bancroft (1952) e Weir (1990).	22
<b>Tabela 3.</b> Esperanças matemáticas dos quadrados médios [E(QM)] para populações (P), indivíduos dentro populações (I/P), conforme Excoffier et al. (1992).	25
<b>Tabela 4.</b> Relação dos <i>primers</i> , suas seqüências de bases e o número de locos (NL), obtidos nas 18 populações de <i>Physalaemus cuvieri</i> .	46
<b>Tabela 5.</b> Relação com o tamanho amostral médio (TM), heterozigosidade (h) e porcentagem de locos polimórficos (LP), por populações de <i>Physalaemus cuvieri</i> .	47
<b>Tabela 6.</b> Quadro de Análise de Variância Molecular para as 18 populações de <i>Physalaemus cuvieri</i> , com base em 126 locos RAPD.	51
<b>Tabela 7.</b> Valores de $\phi_{ST}$ par a para entre as 18 populações de <i>Physalaemus cuvieri</i> , com base em locos RAPD.	51
<b>Tabela 8.</b> Resultados da análise bayesiana de divergência entre as 18 populações de <i>P. cuvieri</i> , incluindo os modelos testados, as estimativas de $f$ , $\theta^B$ , ajuste do modelo (Dbar) e “ <i>Deviant Information Criterion</i> ” (DIC).	52
<b>Tabela 9.</b> Resultados da análise bayesiana de divergência entre as 18 populações de <i>P. cuvieri</i> , incluindo as estimativas de $f$ , $\theta^B$ , a medida da informação $I_e$ e a distância H-d entre a distribuição <i>a posteriori</i> e uma distribuição $\beta$ , para os quatro modelos testados.	53
<b>Tabela 10.</b> Resultados do teste de Mantel (correlação matricial $r$ ) comparando as distâncias genéticas à matrizes de diferença intermunicipais para variáveis de agricultura, ambientais, sócio-econômicas e demográficas, e de paisagem, ou a matrizes de distância euclidiana entre os municípios com base nesses conjuntos de variáveis. Os valores de P foram obtidos utilizando 5000 permutações.	58
<b>Tabela 11.</b> Resultados da seleção de modelos para explicar a divergência genética ao longo das conexões na rede de Delaunay, utilizando o critério de Akaike. Valores de $\Delta_i$ menores do que 2 indicam modelos mais informativos.	62
<b>Tabela 12.</b> Relação das referências dos 28 estudos de diferenciação populacional em anfíbios utilizando diferentes marcadores moleculares, extensão espacial máxima (km) do estudo e valores dos estimadores da estrutura populacional (estimados pelo $F_{ST}$ ou estatísticas relacionadas).	67

## RESUMO

Um dos maiores desafios científicos deste século é desenvolver e implementar estratégias para evitar a perda de uma parcela importante da biodiversidade global, devida principalmente ao aumento acelerado das atividades humanas. Quanto mais fragmentadas e perturbadas as paisagens naturais, maiores são os desafios para a conservação da variabilidade genética, que possui hoje um papel de destaque na definição das estratégias de conservação e manejo de populações naturais. Os dados básicos usualmente obtidos para esses estudos são os chamados marcadores moleculares, que são locos gênicos que apresentam alguma variabilidade no escopo do problema a ser estudado. O objetivo deste trabalho foi utilizar marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) para analisar a estrutura genética de populações de *Physalaemus cuvieri* (Amphibia: Anura: Leptodactylidae) do Cerrado, relacionando-a aos padrões de ocupação humana no Estado de Goiás. Para tanto, 214 indivíduos de *Physalaemus cuvieri* foram coletados em 18 municípios do Estado de Goiás. O DNA dos fígados dos indivíduos foi extraído e utilizados nas reações de PCR com nove *primer* RAPD previamente selecionados. Os 126 locos RAPD analisados mostraram que existe uma estruturação da variabilidade genética entre as 18 populações de *P. cuvieri*, apresentando valores em torno de 0,10 para o componente interpopulacional da variabilidade genética, estimado por três metodologias diferentes (Análise de Variância de Frequências Alélicas, AMOVA e estatística Bayesiana). Apesar de haver diferenças entre as populações para os locos, não há um padrão espacial da variabilidade genética claro, de acordo com as análises multivariadas (UPGMA e NMDS) e com o teste de Mantel correlacionando os valores de  $\Phi_{ST}$  às distâncias geográficas ( $r = 0,140$ ;  $P = 0,129$ , com 5000 permutações). O correlograma multivariado, entretanto, mostrou uma correlação significativa na primeira classe de distância geográfica (até 180 km), indicando que o fluxo gênico deve estar restrito a populações próximas geograficamente. Deste modo, é possível assumir, a princípio, que as populações desta espécie estão evoluindo atualmente sob um modelo de isolamento-por-distância. De um modo geral, as correlações entre a matriz de distância genética e as diferenças nas 38 variáveis ambientais e sócio-econômicas não foram significativas pelos testes de Mantel, mostrando que a divergência genética entre as populações não pôde ser explicada simplesmente por diferenças nos valores dessas variáveis. A análise de descontinuidade genética mostrou, por outro lado, que os próprios valores absolutos podem explicar algumas das divergências genéticas, pois as barreiras entre as populações locais parecem estar associadas a efeitos de fragmentação de habitat em grandes escalas espaciais. As variáveis que melhor explicaram estas descontinuidades foram o ano de instalação dos municípios e a população humana atual. Assim, o processo de seleção de modelos

explicativos (critério de Akaike) tendeu a priorizar características gerais de ocupação humana no Estado de Goiás, que estariam afetando indiretamente as divergências genéticas entre as populações de *P. cuvieiri* por meio da aceleração na fragmentação do habitat natural. A partir do correlograma multivariado e considerando a existência das descontinuidades genéticas foi possível também estabelecer um total de 11 Unidades Operacionais Intraespecíficas para a conservação da variabilidade genética presente nas populações de *P. cuvieiri*. Embora essa estratégia maximize a representatividade do padrão de variabilidade genética interpopulacional, é preciso garantir que cada uma delas, independentemente, seja capaz de manter populações mínimas viáveis com pouca perda de diversidade genética por efeitos de deriva ou endogamia, principalmente na região mais fragmentada do Estado (sudeste e sul).

**Palavras-chave:** Genética da Conservação; RAPD; *Physalaemus*; fragmentação; ocupação humana; Cerrado; Goiás; variabilidade genética; análise espacial

## ABSTRACT

One of the great challenges of the current century is to develop and implement strategies to avoid losing an important amount of global biodiversity, due to increasing magnitude of human disturbances on natural environments. As these processes of fragmentation and disturbance increase, it becomes more difficult to conserve genetic diversity, which is today very important to define these strategies for conserving and managing natural populations. The basic data used today for accessing genetic variability are the so-called molecular markers, which are loci that show variability within the spatial and hierarchical domain to be evaluated. The aim of this paper was to use RAPD markers (*Random Amplified Polymorphic DNA*) to analyze genetic population structure of *Physalaemus cuvieri* (Amphibia: Anura: Leptodactylidae) populations in Brazilian Cerrado, correlating this structure with spatial and temporal patterns of human occupation in Goiás State. A total of 214 individuals of *Physalaemus cuvieri* were collected from 18 municipalities of Goiás State. The DNA was extracted from liver and used in PCR reactions with nine RAPD *primers* previously selected. The 126 RAPD loci analyzed revealed a significant interpopulational component for *P. cuvieri*, with values around 0.10 using three distinct methodologies (Analysis of Variance of Allele Frequencies, AMOVA and a new Bayesian approach). Despite the differences, there are no clear spatial patterns according to multivariate analyses (UPGMA clustering and NMDS ordination) and to a Mantel test correlating pairwise  $\Phi_{ST}$  values to geographic distances ( $r = 0.140$ ;  $P = 0.129$  with 5000 random permutations). A multivariate correlogram, however, showed a significant spatial structure at small geographic distances (up 180 km), indicating that gene flow must be restricted to close local populations. Thus, it is possible to assume, in principle, that populations are evolving under an isolation-by-distance model. In general, Mantel correlations between genetic divergence and the differences in 38 socio-economic variables were not significant. Despite this, analyses of genetic discontinuity showed that absolute values of some of these variables may be important to define genetic divergence, since a visual inspection showed that more barriers appear for highly fragmented and occupied regions of Goiás State. Indeed, the variables that better explained genetic divergence along these barriers were year of municipality creation and current human population. So, the process of modeling using Akaike information criterion prioritized overall characteristics of regional human occupation, that affect indirectly populations of *P. cuvieri* by means of acceleration of habitat fragmentation and loss. Based on multivariate correlogram and considering the existence of some barriers, it was possible to establish 11 Operational

Units for Intraspecific conservation in *P. cuvieri*. Although this strategy optimizes the representation of genetic diversity in a small number of localities or regions, it is important to consider that it must be necessary to establish viable populations within these units with relatively small losses of genetic diversity due to drift and endogamy, especially in the south and southeastern regions of Goiás State, which is now highly occupied by human activities.

**Palavras-chave:** Conservation genetics; RAPD; Physalaemus; fragmentation; Human occupation; Cerrado; Goiás; genetic variability; spatial analyses

## INTRODUÇÃO

Um dos maiores desafios científicos deste século é desenvolver e implementar estratégias para evitar a perda de uma parcela importante da biodiversidade global devida principalmente ao aumento acelerado das atividades humanas (Ewers 2005). De fato, em diversos biomas brasileiros, notadamente a Mata Atlântica e o Cerrado, o processo de ocupação humana fez com que fragmentos pequenos e isolados sejam os únicos representantes atuais da antes abundante cobertura vegetal nativa. Quanto mais fragmentadas e perturbadas as paisagens naturais, maiores são os desafios para a conservação da variabilidade genética natural da espécie (Costa & Scariot 2003; Ficetola & Bernardi 2004). Infelizmente, a magnitude dos recursos existentes para as atividades que promovem a perda da biodiversidade é muitas vezes maior do que os recursos alocados para o estudo e a conservação da vida sobre a terra. Este descompasso fez com que várias organizações desenvolvessem metodologias emergenciais para identificar as áreas mais importantes para ações de conservação em diferentes escalas e para diferentes componentes da diversidade biológica, inclusive a variabilidade genética em nível populacional (Neel & Cummings 2003; Silva 2004).

A análise da variabilidade genética possui hoje um papel de destaque na definição das estratégias de conservação e manejo de populações naturais (Avice & Hamrick 1996). Como os processos microevolutivos, tais como seleção natural, deriva genética e fluxo gênico, atuam nitidamente em um contexto espacial (Manly 1985; Sokal 1986; Slatkin 1985; Gillespie 1998), a sua ação tende a estruturar a variabilidade genética entre e dentro das populações naturais. Em função disso, em muitas situações a análise dessa estrutura pode permitir inferir os principais processos atuando em nível populacional (Sokal & Jacquez 1991). A variação genética pode estar associada ao espaço por processos estocásticos de coalescência (fissão histórica) ou ao fluxo gênico, que é mais intenso entre populações adjacentes. Por outro lado, a variabilidade genética, associada aos padrões fenotípicos, pode estar estruturada no espaço



já que locais mais distantes tendem a estar sujeito a diferentes pressões seletivas em função de diferentes condições ambientais (Avice 2000). Isso mostra, portanto, que o reconhecimento dos processos evolutivos que causam (ou causaram) a diferenciação entre populações locais estruturadas no espaço exige a análise simultânea de caracteres genéticos e fenotípicos nessas populações, além da caracterização ambiental associada à distância geográfica entre elas (Epperson 2003; Rousset 2004).

Assim, passou-se a entender também que o conhecimento da estrutura genética das populações naturais, especialmente quando estabelecido a partir de dados moleculares (marcadores neutros), pode ser de grande importância para estabelecer programas de manejo e conservação destas populações (Crozier 1997). Embora esforços ecológicos, políticos, econômicos, entre outros, tenham sido utilizados para avaliar os riscos de extinção de muitas espécies ameaçadas, quando se pensa numa persistência em longo prazo as características genéticas devem também fazer parte do foco da conservação (Hedrick 2001). Neste contexto, a Biologia da Conservação, uma nova corrente multidisciplinar da ciência, tem se desenvolvido na tentativa de contornar o problema geral das extinções desordenadas das diversas espécies (Primack 1998; Primack & Rodrigues 2001).

Mais especificamente, as áreas da genética da conservação e da ecologia molecular (Beebe & Rowe 2004; Frankham et al. 2003), quando propostas nos anos 1970, resumiam-se praticamente a estimativas de variabilidade genética (heterozigosidade) e a sua extrapolação para a estimativa do tamanho efetivo de populações ameaçadas ou que haviam sofrido estrangulamentos populacionais (*bottlenecks*) recentes (ver Spielman et al. 2004). No entanto, com a maior compreensão pelos geneticistas dos problemas enfrentados pelos conservacionistas, que por sua vez compreenderam melhor o potencial que os marcadores genéticos têm para a abordagem de seus problemas, a genética da conservação voltou a se tornar útil e auxiliar cientistas e pessoas em geral interessadas na conservação ambiental (Solé-Cava 2001). Hoje, a genética da conservação tem por objetivo aliar as modernas teorias

genéticas às novas técnicas moleculares disponíveis com o intuito de reduzir o risco de extinção das espécies, disponibilizando ferramentas de análise que permitam direcionar de forma mais eficiente estratégias de manejo e conservação das espécies (Frankham et al. 2003). Os dados básicos para esses estudos são os chamados marcadores moleculares, que são locos gênicos ou regiões genômicas que apresentam alguma variabilidade no escopo do problema a ser estudado (Avice & Hamrick 1996; Hillis et al. 1996; Ferreira & Grattapaglia 1998; Sunnucks 2001; Perez-Sweeney et al. 2004).

Conforme já discutido, o conhecimento da magnitude e distribuição da variabilidade genética dentro e entre as populações, obtido a partir de dados moleculares, é importante, pois está relacionado com o alcance do fluxo gênico, sistema de acasalamento, taxas de mortalidade, sistema reprodutivo e, conseqüentemente, persistência das populações ao longo do tempo. Por outro lado, sob um ponto de vista de sistemática, a análise da divergência genética entre as populações pode permitir a identificação de unidades evolutivas significativas para a conservação (ESU - *Evolutionary Significant Units* - baseadas em análises filogeográficas com base no DNA mitocondrial – Avice 2000) ou unidades de manejo (MU – *Management Units* – baseadas em padrões de diferenciação atual pela análise do DNA nuclear) (Eizirik 1996; Crozier 1997; Newton et al. 1999). Essas unidades preservariam assim a variabilidade genética intraespecífica tanto em um sentido estrutural (grupos de divergência) de divergências genéticas já existentes, quanto em termos da manutenção de processos evolutivos que estariam ligados à persistência das populações. Nos últimos anos ocorreram vários debates sobre os métodos que podem objetivamente priorizar os programas de conservação num nível intra-específico através do estabelecimento de ESU e MU, ou mesmo sobre a validade de utilização de dados puramente genéticos, e não a variabilidade adaptativa dos fenótipos, nos programas de conservação (Crandall et al. 2000; Fraser & Bernatchez 2001; Epperson 2003). Dentro desse contexto, Diniz-Filho & Telles (2002) propuseram uma metodologia baseada no padrão espacial da variabilidade genética para definir *Unidades*

*Operacionais* Intraespecíficas. Essas Unidades seriam definidas por populações que mantenham entre si uma distância geográfica mínima, a partir da qual as amostras (populações) passariam a ser consideradas geneticamente independentes. Essa abordagem possibilitaria a otimização de estratégias de conservação da variabilidade intrapopulacional, tanto para definir unidades para conservação *in situ* quanto para delinear esquemas de amostragem para montagem de coleções de germoplasma, de forma que essas unidades mantivessem entre si o máximo de divergência genética possível com o mínimo de esforço ou custo (Diniz-Filho et al. 2003; Manel et al 2003; Telles et al. 2003; Pearse & Crandall 2004; Tomimatsu et al. 2004; Watts et al. 2004).

Muitas dessas estratégias para avaliar a variabilidade intraespecífica, por sua vez, só se tornaram efetivamente operacionais após o desenvolvimento das técnicas baseadas em DNA que ocorreu nos anos 80, trazendo grandes avanços nos estudos de Genética e sua aplicação em diferentes áreas da Ciência. O desenvolvimento de tecnologias baseadas na Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) gerou uma revolução científica, introduzindo novas ferramentas muito mais poderosas para estudos genéticos (Erlich et al. 1991; Hillis et al.1996; Beebe & Rowe 2004). Muitos métodos tradicionais de clonagem, sequenciamento e análise de polimorfismo foram acelerados ou substituídos por inúmeras variações da técnica de PCR (Ferreira & Gratapaglia 1998). Uma dessas variações é a tecnologia RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), que envolve a amplificação simultânea de vários locos anônimos no genoma utilizando *primers* de seqüência arbitrária, e tem sido descrita como um método fácil e simples de detecção de polimorfismo. Essa tecnologia foi divulgada nos anos 90 por dois laboratórios independentes (Williams et al. 1990; Welsh & McClelland 1990). Este método tem considerável vantagem sobre os demais marcadores moleculares normalmente utilizados em estudos populacionais, principalmente em termos da rapidez na obtenção dos dados, generalidade e baixo custo das análises. Além disso, permite a utilização de uma quantidade muito pequena de DNA, pode ser usada em

qualquer espécie e possibilita a detecção de polimorfismo em qualquer tipo de seqüência do genoma (Hadrys et al. 1992).

Os marcadores RAPD têm sido criticados, desde o seu surgimento, pelo seu baixo potencial de repetibilidade ou reprodutibilidade (Ellsworth et al. 1993; Schweder et al. 1995). No entanto, alguns autores têm argumentado que quando as condições de amplificação podem ser controladas durante o experimento, a maioria das bandas se repete, tornando-se uma poderosa ferramenta que poderá ser utilizada quando os devidos cuidados forem tomados (Williams et al. 1990; Arnold et al. 1991; Perez et al. 1998; Goulão et al. 2001; Kajolner et al. 2004). Entre as diversas aplicações, o RAPD tem sido muito utilizado em estudos de determinação de paternidade ou identificação de espécies (e.g., Lewis & Snow 1992; Arslan et al. 2005), mapeamento (e.g., Michelmore et al. 1991; Thomas et al. 2005; Liu et al. 2005), taxonomia e caracterização de germoplasma (e.g., Chapco et al. 1992; Uptmoor et al. 2003, Simon 2005; Smith et al. 2005) e genética de populações e conservação (e.g., Haig et al. 1994; Kimberling et al. 1996; Chassin-Noria et al. 2004; Padilla et al. 2004; Sheng et al. 2004; Barbanera et al. 2005) (ver Apêndice 1 para uma análise cientométrica da utilização de marcadores RAPD em Genética de Populações e Genética da Conservação).

## **OBJETIVOS**

### ***Geral***

O objetivo geral deste trabalho foi analisar a estrutura genética de populações de *Physalaemus cuvieri* (Amphibia: Anura: Leptodactylidae) do Cerrado, relacionando-a aos padrões de ocupação humana no Estado de Goiás. A análise dessa relação é importante tanto para explicar os padrões espaciais da variabilidade genética atual por processos de fragmentação de habitats, quanto para definir futuros programas de conservação e manejo dessa espécie e do Cerrado como um todo.

### ***Específicos***

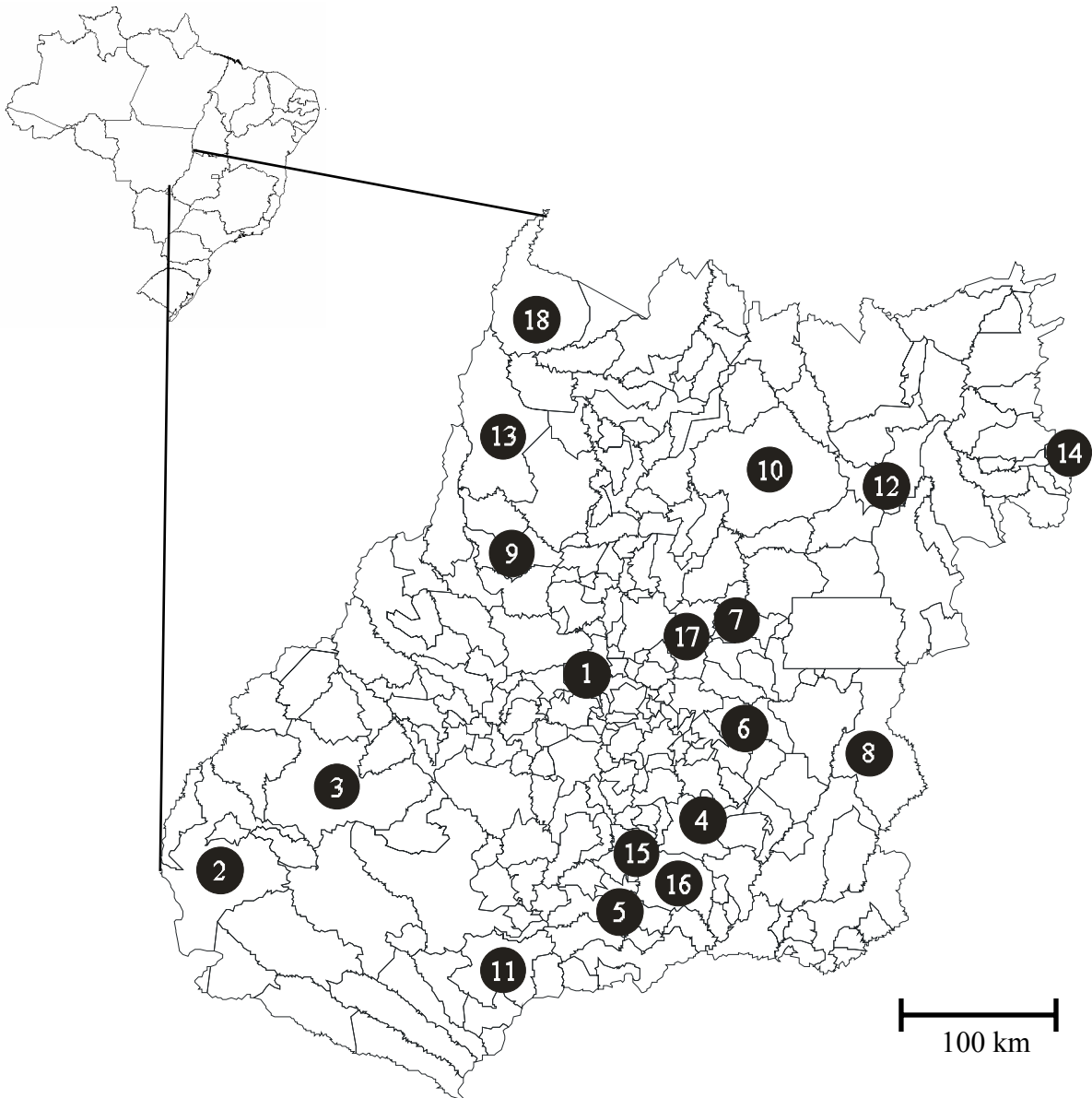
1. Utilizar marcadores moleculares no nível de DNA (RAPD) para caracterizar a variabilidade genética entre e dentro de populações naturais de *Physalaemus cuvieri*, bem como os seus padrões espaciais utilizando técnicas de análise multidimensional e autocorrelação espacial;
2. Associar os padrões espaciais da variabilidade genética encontrados à história da ocupação humana recente na região do Cerrado, verificando se as unidades evolutivas intra-específicas estabelecidas podem ser explicadas com base nas interrupções do fluxo gênico e isolamento geográficos causados por processos históricos (i.e., crescimento populacional humano) e geográficos (i.e., expansão de fronteiras agrícolas e fragmentação de habitat) associados aos efeitos antrópicos;
3. Utilizar os padrões de autocorrelação espacial para delinear Unidades Operacionais, definindo estratégias para a conservação da variabilidade genética dessa espécie e avaliando como as políticas atuais para a conservação da biodiversidade no Cerrado possibilitariam a preservação da variabilidade genética existente.

## REGIÃO DE ESTUDO

Os indivíduos de *Physalaemus cuvieri* foram coletados em 18 municípios do Estado de Goiás (Tabela 1; Figura 1), estando localizados no bioma Cerrado. O Cerrado é a segunda maior província biogeográfica brasileira, superado em área apenas pela floresta Amazônica. São cerca de dois milhões de km<sup>2</sup>, equivalentes a aproximadamente 22% do território brasileiro, espalhados por 10 Estados (Goiás, Tocantins e o Distrito Federal, parte dos Estados da Bahia, Ceará, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Piauí, Rondônia e São Paulo). Essa região é cortada por três das maiores bacias hidrográficas da América do Sul (Tocantins, São Francisco e Prata), o que favorece a manutenção de uma elevada biodiversidade (Rizzini 1997).

**Tabela 1.** Localidades, coordenadas geográficas e número de indivíduos de *Physalaemus cuvieri* amostrados e mesoregiões do Estado de Goiás.

População	Município	Nº de indivíduos	Longitude	Latitude	Mesorregião
1	Itaberaí	8	-49,81	-16,02	Centro Goiano
2	Mineiros	12	-52,551	-17,569	Sul Goiano
3	Caiapônia	10	-51,81	-16,957	Sul Goiano
4	Piracanjuba	10	-49,018	-17,303	Sul Goiano
5	Goiatuba	10	-49,357	-18,013	Sul Goiano
6	Silvânia	7	-48,608	-16,659	Sul Goiano
7	Cocalzinho de Goiás	11	-48,776	-15,794	Leste Goiano
8	Cristalina	10	-47,614	-16,769	Leste Goiano
9	Araguapaz	10	-50,632	-15,091	Noroeste Goiano
10	Niquelândia	10	-48,46	-14,474	Norte Goiano
11	Quirinópolis	23	-50,452	-18,448	Sul Goiano
12	São João d'Aliança	12	-47,525	-14,706	Norte Goiano
13	Nova Crixás	11	-50,327	-14,099	Noroeste Goiano
14	Mambaí	7	-46,113	-14,488	Leste Goiano
15	Pontalina	21	-49,449	-17,526	Sul Goiano
16	Morrinhos	7	-49,101	-17,732	Sul Goiano
17	Pirenópolis	20	-48,959	-15,852	Leste Goiano
18	São Miguel do Araguaia	15	-50,163	-13,275	Noroeste Goiano



**Figura 1.** Mapa com os Municípios do Estado de Goiás e a localização das áreas de coleta de *Physalaemus cuvieri*.

As formações fito-fisionômicas típicas do Cerrado ocorrem ainda, de forma descontínua, em outras regiões no Brasil, desde 4° de latitude norte a 24° de latitude sul, e 42° a 65° de longitude oeste (Ranzani 1971; Ribeiro & Walter 1998). Essas áreas disjuntas existem ao norte do Amapá, Amazonas, Pará e Roraima, e ao sul, em pequenas “ilhas” no Paraná. No território brasileiro, portanto, ‘enclaves’ de Cerrado existem na Floresta Amazônica, Floresta Atlântica, Caatinga (Eiten 1994) e no Pantanal (Allem & Valls 1987).

O Cerrado caracteriza-se por suas diferentes fito-fisionomias, que vão desde o cerradão, com árvores altas, densidade maior e composição distinta, passando pelo cerrado

típico (*sensu stricto*) mais comum no Brasil central, com árvores baixas e esparsas, até as formações de campo cerrado, campo sujo e campo limpo, com progressiva redução da densidade arbórea. Ao longo dos rios há também um tipo com características florestais, conhecido como floresta de galeria ou mata ciliar (Rezende 1998; Ribeiro et al. 2001). O cerrado típico (*sensu stricto*) é uma savana tropical na qual a vegetação herbácea coexiste com muitas espécies de árvores e arbustos esparsos. O solo, antigo e profundo, ácido e de baixa fertilidade, tem altos níveis de ferro e alumínio (Laurie 1975; Rizzini 1997).

Devido ao elevado número de espécies endêmicas de plantas (1,5% das espécies endêmicas da flora mundial) e à elevada perda de área (20% da área original), o Cerrado foi recentemente considerado um dos *hotspots* mundiais de diversidade (Myers et al. 2000; Oliveira & Marquis 2002). Para vertebrados terrestres, o endemismo varia de 3% (Aves) a 28% (Anfíbios). O Cerrado abriga ainda cerca de 13%, 35% e 23% da riqueza de espécies de borboletas, abelhas e cupins neotropicais (Cavalcanti & Joly 2002). No contexto de *hotspots*, é preciso considerar ainda a área alocada para unidades de proteção integral para conservação (cerca de 6% da área remanescente) é pequena, o que torna ainda mais urgente a necessidade de entender os padrões de biodiversidade a fim de ampliar de forma efetiva o potencial de proteção.

Em um sentido amplo, o problema na conservação dos Cerrados, de fato, tem raízes nas políticas agrícola e de mineração impróprias, e no crescimento rápido da população humana na região. Historicamente, a expansão agropastoril e o extrativismo mineral no Cerrado têm se caracterizado por um modelo de expansão de área com baixa eficiência relativa, com elevado impacto ao meio ambiente (Klink & Moreira 2002). Assim, pelo seu potencial agrícola e por sua grande biodiversidade, os Cerrados têm sido alvo de um volume crescente de estudos objetivando o seu melhor conhecimento (e.g., Pinto 1994; Ribeiro et al. 2001; Oliveira & Marquis 2002). Tais estudos, que buscam a ampliação e intensificação de conhecimentos sobre as espécies e ecossistemas dos Cerrados, exigem notoriamente uma



abordagem multidisciplinar, objetivando o conhecimento das espécies sob seus aspectos taxonômicos, genéticos, evolutivos, fisiológicos, ecológicos e sócio-econômicos.

O Estado de Goiás situa-se na região mais central do bioma Cerrado, no denominado Planalto Central brasileiro, onde predomina um relevo constituído de superfícies aplainadas, situadas em altitudes que oscilam entre 400 e 1000 metros. O clima dominante é quente e semi-úmido, com duas estações climáticas bem definidas, uma chuvosa e outra seca. Por possuir importantes nascentes e rios, esse planalto atua como importante dispersor de águas. O Estado está dividido politicamente, desde 2001, em 246 municípios distribuídos em 18 microrregiões geográficas, que por suas vez estão reunidas em cinco mesoregiões (Galinkin 2003).

A distribuição espacial da população do Estado de Goiás mostra contrastes entre grandes adensamentos e áreas pouco ocupadas. Essa desigualdade é reflexo da dinâmica econômica no tempo histórico, que produz economias na concentração geográfica de atividades, privilegia tipos de ocupação e de uso de fatores naturais, e predispõe certas porções do território a determinadas atividades produtivas (Ajara 1989; Galinkin 2003). Isso resultou no avanço da população migrante em direção a terras devolutas, disponíveis no Estado até meados do século XX. A população humana originária, sobretudo, da região sudeste do Brasil, tinha como atração, até o início dos anos 50, as terras férteis do sudoeste de Goiás que naquela época eram cobertas por matas. A partir de 1950, os grandes fluxos migratórios rurais se direcionaram para a fronteira agrícola em expansão, consolidando núcleos já existentes na porção sul do Estado. Mais recentemente, observou-se a predominância do fluxo migratório com destino urbano, catalisado pelos municípios próximos à capital do Estado e no Entorno de Brasília (Galinkin 2003).

O início da ocupação do território goiano ocorreu ainda no período colonial (final do séc. XVII e início do séc. XVIII), com a exploração aurífera que se dava em torno de núcleos urbanos, povoados criados para servir de base ao assentamento e à atividade econômica.

Baseada na exploração do ouro de aluvião, a mineração durou um período relativamente curto, cerca de 50 anos. Com o declínio dessa principal atividade econômica, Goiás experimentou um longo período de estagnação, e até mesmo de regressão econômica, ao longo do século XIX. A falta de estradas e rios facilmente navegáveis dificultou o comércio com outras regiões, limitando as possibilidades de crescimento e desenvolvimento sócio-econômico. Apesar disso, as características do Cerrado, com formações abertas propícias ao desenvolvimento de gramíneas, permitiram o surgimento de uma outra atividade econômica: a criação de bovinos. No início os recursos tecnológicos para a derrubada de floresta eram rudimentares para a formação de pastagem, mas o fato de existirem pastagens naturais em abundância fez com que a pecuária extensiva surgisse como a mais importante atividade econômica na região (Galinkin 2003).

Nas primeiras décadas do século XX iniciou-se a ocupação agrícola de Goiás. A crise de abastecimento alimentar nos grandes centros urbanos do País, agravada pelas crises do café no sudeste, principalmente em São Paulo, começou a atrair levas de migrantes para Goiás, em especial para o sul do Estado, já que ali existiam terras férteis em áreas de florestas e de pastagem naturais. Na década de 1940, o governo federal lançou o programa “marcha para o oeste”, responsável pela aceleração dos fluxos migratórios para Goiás (Borges 2000). A propaganda das terras férteis de Goiás atraiu um contingente de imigrante muito maior do que o esperado, considerando a disponibilidade de estabelecimentos disponíveis na Colônia Agrícola Nacional de Goiás, com sede em Ceres (Carvalho & Podestá-Filho 1989; Galinkin 2003).

Com a transferência da Capital do Brasil para Brasília em 1960, inaugurou-se uma nova fase de ocupação do território goiano e na exploração das terras e dos recursos minerais. Com a implantação de Brasília, houve a ampliação da malha viária por meio de asfaltamento e construção de modernas rodovias, o que estimulou a vinda de migrantes de todo o país, provocando o rápido avanço da fronteira agrícola. Sob um ponto de vista sociológico, esse

processo refletiu a penetração do capitalismo na agricultura, tanto no nível do indivíduo (agricultor) quanto na formação de estruturas em maior escala como cooperativas e unidades agro-industriais (Miziara 2000). O alto investimento dos governos Federal e de Goiás na pesquisa agrônômica, através da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) e da Empresa Goiana de Pesquisa Agropecuária (Emgopa), e os resultados obtidos a partir de meados dos anos 60, transformaram os solos do Cerrado, de baixa fertilidade natural, em áreas de agricultura comercial – tecnificada e mecanizada – altamente produtivas, através da correção da acidez e da adubação química, o que tornou o Estado de Goiás uma das áreas de maior potencial agrícola do país (Mesquita 1989).

A disponibilidade de solos, que com as novas tecnologias agrícolas se tornaram aptos à produção de grãos, foi decisiva para o rápido crescimento econômico que se verificou no Estado nas três últimas décadas do século XX. A expansão da fronteira agrícola com esse modelo de produção altamente capitalizado fez com que a economia de Goiás crescesse. Todavia, da mesma forma que aconteceu na esfera nacional, esse processo levou ao despovoamento do espaço rural, aumento das desigualdades sociais e concentração de renda (Mesquita 1989). Além disso, como havia uma desvalorização cultural do Cerrado, esse processo mostrou-se devastador da biodiversidade local, já que não havia qualquer cuidado no sentido de preservá-la. Assim, esse processo de ocupação humana, nos últimos anos, levou a um processo intenso de fragmentação e perda de habitats e, em consequência, perda de biodiversidade em diferentes níveis da hierarquia biológica, como vem acontecendo em todo o planeta (Carnaval 2002; Fahrig 2003; Whittaker et al. 2005).

## ESPÉCIE ESCOLHIDA

Os Anfíbios, de uma maneira geral, têm sido utilizados como bioindicadores de ambientes alterados por serem animais muito sensíveis às mudanças no seu habitat natural. Investigações sobre as respostas desses organismos às alterações ambientais são importantes para a Biologia da Conservação, pois existem evidências quantitativas sobre o declínio de várias de suas populações em todo o mundo (Houlahan et al. 2000; Stuart et al. 2004). Além disso, muitas espécies de Anfíbios têm pouca mobilidade e são altamente especializados em seus habitats, gerando estruturas meta-populacionais que requerem uma atenção especial em programas de Conservação (Marsh & Trenham 2001; Smith & Green 2005). Deste modo, as espécies de Anfíbios são consideradas ótimos organismos-modelo para testar os efeitos da fragmentação da paisagem e da perda de habitats (Ficetola & Bernardi 2004; Palo et al. 2004a).

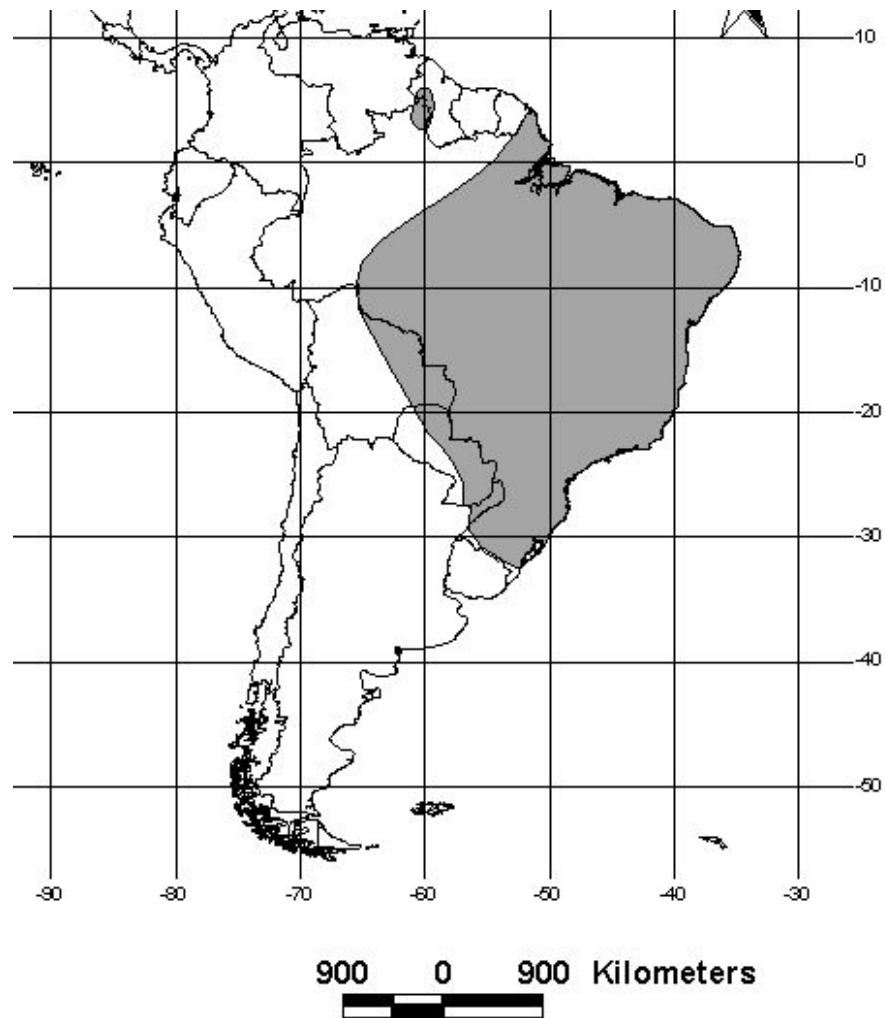
De fato, alguns estudos recentes (Driscoll 1998; Batista 2001; Bos & Sites-Jr 2001; Marsh & Trenham 2001; Palo et al. 2003; Ficetola & Bernardi 2004; Gray et al. 2004; Palo et al. 2004a,b) têm demonstrado que as populações de Anfíbios são realmente muito sensíveis a esses processos. Isso cria uma elevada estruturação na variabilidade genética, o que, conforme já discutido, possui grande importância para a definição de estratégias de conservação. Assim, espécies que são localmente abundantes e/ou têm maior área de distribuição geográfica, tais como *Bufo paracnemis*, *Hyla albopunctata*, *H. minuta*, *Leptodactylus ocellatus* e *Physalaemus cuvieri*, entre outras poderiam servir como organismos-modelo para avaliar esses processos de fragmentação da paisagem e da perda de habitats na região do Cerrado (Colli et al. 2002).

O gênero *Physalaemus* Fitzinger, 1826 (família Leptodactylidae) caracteriza-se por ser um táxon bastante heterogêneo que inclui cerca de 40 espécies distribuídas do México ao sul da América do Sul (Frost 1985; Duellman 1994; Frost 2004). Foram reconhecidos quatro grupos de espécies para o gênero: *P. biligonigerus*, *P. signifer*, *P. pustulosus* e *P. cuvieri*

(Nascimento et al. 2001). A espécie estudada neste trabalho (*P. cuvieri*) é conhecida popularmente como “rã-cachorro” (Figura 2) e possui ampla distribuição geográfica na região centro-leste da América do Sul (Figura 3), ocorrendo desde o nordeste Brasileiro até o leste do Paraguai e norte da Argentina. Cerca de 25% de sua área de distribuição está restrita ao Cerrado (Frost 1985; Base de dados do *Global Amphibian Assessment*, 2005). Algumas informações acerca da biologia desta espécie estão disponíveis em Bokermann (1962a,b), Duellman & Trueb (1994).



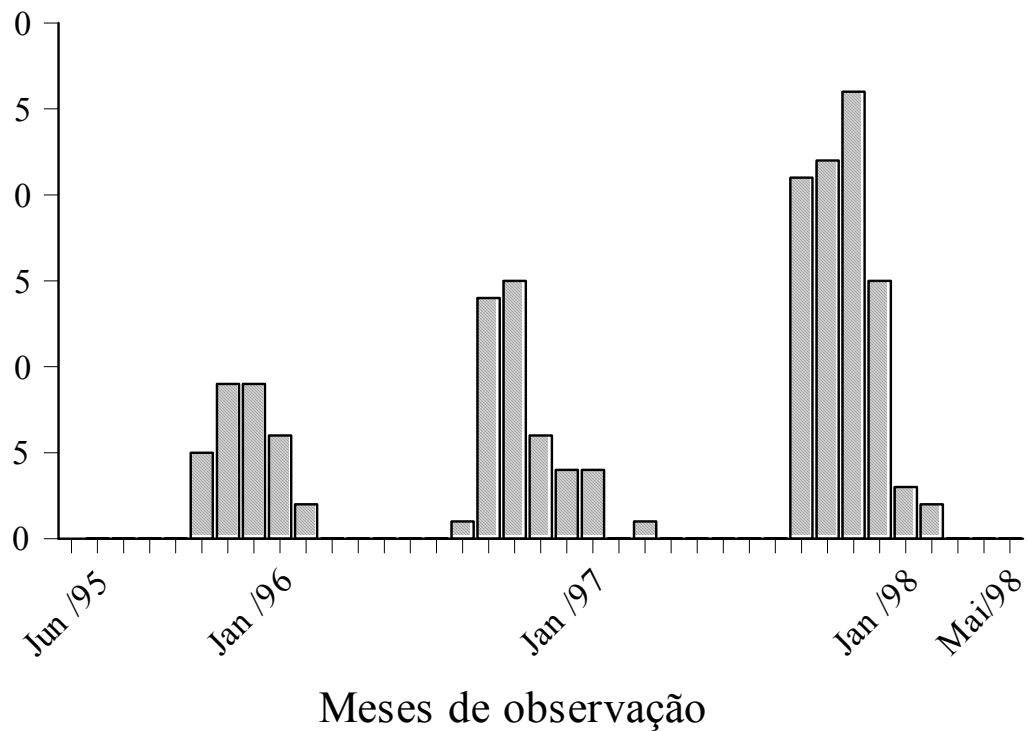
**Figura 2.** *Physalaemus cuvieri* Fitzinger, 1826 (Anura: Leptodactylidae).



**Figura 3.** Extensão de ocorrência de *Physalaemus cuvieri* (Base de dados do *Global Amphibian Assessment*, 2005).

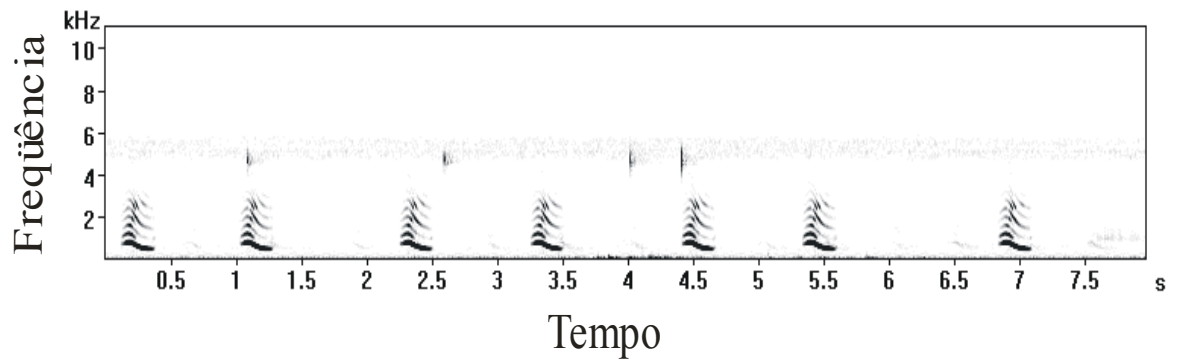
Os machos de *P. cuvieri* agregam-se em arenas, vocalizando na margem de corpos de água temporários ou permanentes (Bastos et al. 2003; Bokermann 1962a,b). Geralmente, os primeiros indivíduos são observados no começo da estação chuvosa (Barreto & Andrade 1995). Entre 1995 e 1998, uma população de *P. cuvieri* foi acompanhada por R. P. Bastos (dados não-publicados), na Floresta Nacional de Silvânia, Estado de Goiás (Figura 4). Verificou-se um padrão sazonal de atividade, com indivíduos observados em vocalização durante a estação chuvosa, havendo correlação positiva e significativa com a temperatura mínima do ar ( $r_s = 0,54$ ;  $p = 0,0013$ ;  $n = 34$  meses). A vocalização de anúncio (Figura 5)

apresenta estrutura harmônica, estando descrita em Bastos et al. (2003). O amplexo é axilar e os ovos são depositados em ninhos de espuma, sobre a água (Figura 6). Para a produção do ninho, o macho bate com as pernas o muco que é liberado com os ovos durante a oviposição, enquanto está em amplexo, como ocorre em outras espécies do gênero (Hödl 1990)



**Figura 4.** Abundância mensal de *Physalaemus cuvieri*, entre junho de 1995 e maio de 1998, na Floresta Nacional, Silvânia, estado de Goiás.





**Figura 5.** Vocalizações de anúncio de indivíduo de *Physalaemus cuvieri* da Floresta Nacional, Silvânia, estado de Goiás. Temperatura do ar = 25°C. Temperatura da água = 27,5°C.



**Figura 6.** Desovas de *Physalaemus cuvieri*, na Floresta Nacional, Silvânia, Estado de Goiás.

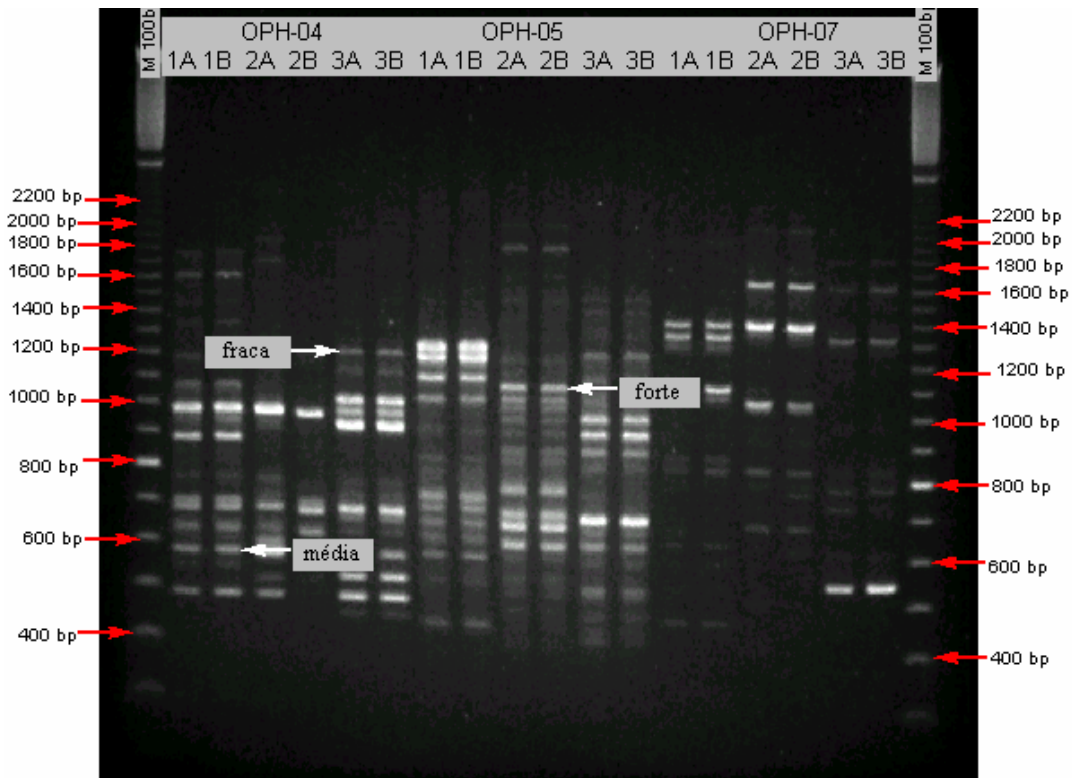


## MATERIAL E MÉTODOS

### *Obtenção de Dados Moleculares*

Os dados moleculares foram obtidos no Laboratório de Genética e Melhoramento da Universidade Católica de Goiás. O DNA dos fígados de 214 indivíduos de *Physalaemus cuvieri*, pertencentes a 18 populações distribuídas no Estado de Goiás (Tabela 1 e Figura 1), foi extraído utilizando o kit de purificação de DNA de tecido, fornecido pela *Amersam Pharmacia Biotech<sup>TM</sup>*. Depois de extraído, o DNA de cada indivíduo foi quantificado com o auxílio do fotodocumentador KODAK EDAS 120, utilizando o marcador *Low-DNA Mass*, fornecido pela Invitrogen.

Para a escolha dos melhores *primers* foram realizados testes de amplificação e de repetibilidade de 60 *primers* de RAPD, fornecidos pela *OPERON<sup>TM</sup>*. Nestas análises, as reações de PCR foram montadas com o DNA de três indivíduos com duas repetições de cada, totalizando 6 amostras. Os géis foram codificados considerando a presença e ausência da banda em cada amostra, bem como a sua intensidade. Foram consideradas três faixas de intensidade de banda, fraca (1), média (2) e forte (3) (Figura 7). Foi calculada uma intensidade média por loco, considerando todas as amostras. A repetibilidade foi estimada por loco, para cada amostra de DNA e também uma frequência de repetibilidade considerando todas as amostras, que foi realizada com base em quatro classes de repetibilidade 0 (não repetiu), 1 (repetiu apenas em um indivíduo), 2 (repetiu em dois indivíduos) e 3 (repetiu nos três indivíduos). Com base em uma avaliação detalhada do padrão de bandas e da repetibilidade foram escolhidos nove *primers* (OPA-07, OPA-08, OPA-13, OPA-20, OPC-05, OPC-08, OPC-20, OPH-04 e OPH-05) para a análise da variabilidade inter e intrapopulacional.



**Figura 7.** Fragmentos RAPD amplificados dos *primers* OPH-4, OPH-5 e OPH-7 com três indivíduos de *Physalaemus cuvieri*. As colunas “M 100bp” indicam o marcador de peso molecular (100 base pair ladder, Pharmacia). Estão representados os limites superiores das intensidades de banda fraca e média e o limite inferior da intensidade forte.

As reações de PCR para um sistema com o volume final de 20 $\mu$ l foram montadas da seguinte forma: 3 $\mu$ l de DNA (~3ng/ $\mu$ l); 1,5 $\mu$ l de *primer* (~10ng/ $\mu$ l); 2,6 $\mu$ l tampão da enzima (10X); 0,78 $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> (50mM); 2,08 $\mu$ l de d’NTP (2,5mM); 0,2 $\mu$ l da enzima Taq-Polimerase (5 unidades/ $\mu$ l - fornecida pela *Amersham Pharmacia Biotech™*) e completando o volume com 9,84 $\mu$ l de H<sub>2</sub>O *Milli-Q*. A amplificação dos fragmentos de DNA via reação em cadeia da polimerase (PCR), no termociclador, foi feita utilizando um programa com os seguintes passos: (1<sup>o</sup>) desnaturação do DNA a 96 $^{\circ}$ C por 3 minutos e (2<sup>o</sup>) a 92 $^{\circ}$ C por 1 minuto; (3<sup>o</sup>) anelamento do *primer* a 35 $^{\circ}$ C por 1 minuto; extensão da molécula pela enzima *Taq polimerase* a 72 $^{\circ}$ C por 1 minutos; (5<sup>o</sup>) 40 ciclos seguindo do 2<sup>o</sup> ao 4<sup>o</sup> passo; (6<sup>o</sup>) passo final de extensão de 3 minutos a 72 $^{\circ}$ C para finalizar os produtos amplificados.

Os fragmentos de DNA obtidos (bandas), para os nove *primers* nas 18 populações, foram analisados pela técnica de eletroforese em gel de agarose 1,5% com a utilização de um tampão TBE (Tris Borato EDTA – 1X) e, em seguida, corados com brometo de etídio, visualizados com o auxílio de um transiluminador de luz ultravioleta e fotografados para as análises posteriores (Ferreira & Grattapaglia 1998). Os géis foram codificados considerando a presença (1) e ausência (0) da banda em cada amostra, nos diferentes locos de cada *primer*.

### ***Estimativa de Frequências Alélicas e Parâmetros Genéticos Básicos***

Os dados binários (presença ou ausência de bandas nos indivíduos) obtidos a partir do RAPD foram utilizados para estimar as frequências alélicas, com base na metodologia proposta por Lynch & Milligan (1994). Essa metodologia é a teoria matemática desenvolvida para estimar parâmetros populacionais a partir de dados de RAPD que parte de dois pressupostos básicos: 1) as bandas são inequivocadamente identificadas no gel e cada banda pode ser associada a um loco com dois alelos, sendo que o caráter “dominante” do marcador impede a distinção entre os genótipos heterozigoto e homozigoto “dominante”. 2) As populações devem estar em equilíbrio de Hardy-Weinberg. A partir desses parâmetros, a frequência do alelo “nulo”  $\hat{q}$ , pode ser estimada por:

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

onde  $\hat{x}$  é a proporção dos N indivíduos analisados na população que não apresentam banda para o locos, sendo  $Var(\hat{x}) = \frac{\hat{x}(1-\hat{x})}{N}$ .

Essa correção minimiza o viés na estimativa de “q” devido a tamanhos amostrais pequenos, mas pode ser grande se o alelo for raro ( $x < 0,1$ ). Assim, Lynch & Milligan (1994) recomendam que o valor de  $\hat{q}$  seja obtido apenas para  $x > 1-(3/N)$ , que é o caso da maior parte das bandas nas populações de *Physalaemus cuvieri*. As frequências alélicas foram então

utilizadas para o cálculo das medidas de variabilidade para cada população, conforme sugerido por Alfenas et al. (1991, 1998) e Weir (1996).

### ***Estrutura Genética Populacional***

A avaliação da estruturação da variabilidade genética foi realizada com base em três metodologias diferentes. A primeira metodologia foi a Análise de Variância de frequências alélicas, conforme descrita em Weir (1996). Essa metodologia fornece estimadores de diversidade que permitem investigar o padrão de variabilidade das frequências alélicas em um modelo hierárquico. Os dados foram coletados com um desbalanceamento, com números diferentes de indivíduos por população. Os estimadores de diversidade permitem investigar o padrão de variabilidade das frequências alélicas em um modelo hierárquico. No caso presente, tem-se  $\theta$  o coeficiente de coancestralidade. O estimador  $\theta$  é uma medida de diferenciação entre populações e é consequência da correlação entre genes de diferentes indivíduos na mesma população (Cockerham, 1973; Weir & Cockerham, 1984). Os intervalos de confiança foram obtidos por um procedimento de reamostragem sobre todos os locos, denominado *bootstrap*. Esse procedimento consiste em reamostrar os locos da matriz de dados genéticos, com reposição, e recalculando todas as estatísticas desejadas. Neste caso, foram utilizados 1000 reamostragens para estabelecer um intervalo de confiança a 95% para os valores de  $\theta$ . Se estes intervalos de confiança incluírem o valor do parâmetro (no caso, zero) isso indica que não há estruturação da variabilidade genética nos níveis hierárquicos testados.

A segunda metodologia utilizada foi a Análise de Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier et al. 1992), que permite desdobrar a distância entre e dentro de populações locais, utilizando uma estratégia semelhante à realizada na ANOVA convencional, mas parte de uma matriz de distância euclidiana calculada entre indivíduos com base na presença e ausência das bandas RAPD. Indivíduos podem também ser agrupados, de acordo com estes critérios não

genéticos tal como geográficos, ecológicos e ambientais. O modelo matemático, apropriado para análise é dado por

$$X_{ij} = x + \alpha_i + \beta_{j(i)}$$

onde,

$x$  = constante do modelo

$\alpha$  = é o efeito da população com variância  $\sigma_\alpha^2$ ,

$\beta$  = é o efeito do indivíduo com variância  $\sigma_\beta^2$ ,

Note-se que os efeitos são hierarquizados. A análise de variância obedece ao esquema da Tabela 3.

**Tabela 3.** Esperanças matemáticas dos quadrados médios [E(QM)] para populações (P), indivíduos dentro populações (I/P), conforme Excoffier et al. (1992).

Fonte de Variação	Grau de liberdade	SQ <sup>1</sup>	QM <sup>1</sup>	E(QM)
Populações (P)	P - 1	S <sub>a</sub>	Q <sub>a</sub>	$\sigma_b^2 + 2\sigma_a^2$
Indivíduo (I/P)	N - P	S <sub>b</sub>	Q <sub>b</sub>	$\sigma_b^2$
Total	N - 1	S <sub>T</sub>		

O componente de variância inter-populacional é extraído por equações das esperanças de quadrado médio (QMD), conforme a análise de variância convencional das frequências alélicas, utilizadas para estimar o  $F_{ST}$  (Cockerham 1969, 1973). O mesmo procedimento pode ser empregado com base no desdobramento da soma de quadrado entre as distâncias, utilizando as chamadas estatísticas- $\Phi$ . Neste caso,  $\sigma^2 = \sigma_a^2 + \sigma_b^2$ ;  $\Phi_{ST}$  é interpretado como a correlação de haplótipos aleatórios dentro de populações, relativo a cada par aleatório de haplótipos puxado do total da espécie. Como na ANOVA convencional, pode-se rescrever essas equações em termos das estatísticas  $\Phi$  entre as populações locais, de modo que:

$$\Phi_{ST} = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_a^2 + \sigma_b^2},$$

Para obter uma distribuição nula dessas estatísticas, foram utilizados procedimentos de aleatorização, por permutações aleatórias das fileiras (e colunas correspondentes) da matriz de distâncias quadráticas (Mantel 1967). Os componentes de variância foram estimados para cada uma das matrizes permutadas (cerca de 1000 permutações).

A terceira metodologia para estimar a divergência entre as populações é baseada em estimadores que são obtidos utilizando estatística Baysiana e foi proposta Holsinger et al. (2002), e implementada utilizando o programa HICKORY v. 1.0 (Holsinger & Lewis, 2003). A notação a seguir foi proposta por Holsinger (1999) e Holsinger et al. (2002), baseada em uma analogia com as formulas para a estimativa das estatísticas- $F$  propostas por Weir e Cockerham (1984). Neste modelo, o  $f$  equivale ao  $F_{IS}$  e o  $\theta^B$  ao  $F_{ST}$ . Para marcadores dominantes a distribuição condicional completa dos parâmetros é dada por:

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

Onde  $P(f)$  e  $P(\theta)$  são a distribuição *a priori* de  $f$  e  $\theta$ ,  $N_{A1,ik}$  e  $N_{A2,ik}$  referem-se ao número de fenótipos dominantes e recessivos no loco  $i$  da população  $k$ .  $P(\pi_i)$  é a distribuição *a priori* da média das frequências alélicas por loco, e  $P(\gamma_{ik} | \pi_i, \theta, f)$  é a frequência fenotípica inicial em cada população. Para calcular  $P(\gamma_{ik} | \pi_i, \theta, f)$  deve-se assumir que a distribuição *a priori* da frequência dos alelos no loco  $i$  na  $k^{ésima}$  população,  $P_{ik}$ , é dada por uma distribuição- $\beta$  com parâmetros  $[(1 - \theta)/\theta]\pi_i$  e  $[(1 - \theta)/\theta](1 - \pi_i)$ . A frequência fenotípica correspondente deve ser calculada como:

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

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

Note-se que o primeiro estágio da verossimilhança consiste de uma amostragem binomial dos fenótipos. Estas equações assumem que são feitas amostragens independentes tanto nos locos quanto nas populações. Amostragens independentes sobre os locos permitem ignorar qualquer dependência de distribuições estatísticas associadas com desequilíbrio gamético ou identidade, de modo que se espera que esses efeitos sejam pequenos. Amostragens independentes sobre as populações já são um pouco mais problemáticas, uma vez que as altas correlações entre as populações podem ocorrer em modelos genéticos realistas devido aos processos espacialmente estruturados de fluxo gênico, especialmente quando o número de populações e a taxa de mutação são pequenos. Como acontece frequentemente em modelos Bayesianos hierárquicos relativamente complexos, as expressões para as distribuições *a posteriori* do  $f$  e do  $\theta^B$  não são disponíveis. Por isso, utiliza-se o método de Cadeia Markoviana por método de Monte Carlo (MCMC) para aproximar a distribuição *a posteriori* do  $f$  e do  $\theta^B$  para qualquer tipo de dado genético.

Os valores da distribuição *a posteriori* de  $f$  e do  $\theta^B$  variam entre 0 e 1. Existem dois caminhos convenientes para sumarizar a distribuição destes dois parâmetros. Podem-se utilizar as informações das médias e os desvios padrões *a posteriori* ou usar diretamente os parâmetros  $\alpha$  e  $\beta$  da distribuição  $\beta$ , que fornece uma boa aproximação da distribuição *a posteriori*. Recomenda-se que se analise das duas formas para uma tomada de decisão sobre a escolha do modelo que melhor se ajusta.

Nesta metodologia não se pressupõe, *a priori*, a existência de endogamia e nem de equilíbrio de Hardy-Weinberg nas populações locais. A distribuição *a posteriori* do estimador  $\theta^B$  se aproxima numericamente à simulação realizada pela MCMC, tendendo a convergir para

a distribuição beta, conforme já discutido. O software HICKORY v 1.0 permite estimar o valor de  $\theta^B$  por meio de quatro modelos diferentes (ver modelo do arquivo para a análise no Apêndice 2). O primeiro é denominado “*full model*”, e permite a estimativa tanto do  $\theta^B$  quanto do  $f$ . O segundo e o terceiro modelos assumem que o  $\theta^B$  e o  $f$  são iguais à zero, respectivamente. Finalmente, devido à estimativa do  $f$  baseado em marcadores dominantes ser usualmente enviesada (especialmente com tamanho amostral pequeno,  $n < 10$ ), o último modelo utilizado pelo HICKORY permite que o  $f$  fique livre para variar. Neste caso, o modelo escolhe valores de  $f$  aleatoriamente para a distribuição *a priori* enquanto estima os outros parâmetros durante a análise pela MCMC. Os resultados destes modelos são então comparados usando o “Deviant Information Criterion (DIC)” (Holsinger, 1999; Holsinger et al., 2002; Spiegelhalter et al., 2002; Holsinger & Wallace, 2004).

Para auxiliar na escolha de um dos quatro modelos, vários parâmetros também são estimados, tais como o  $I_e$ , que é uma medida da informação fornecida na estimativa do parâmetro obtido para aquele conjunto de dados. Valores elevados de  $I_e$  significam mais informação que foi extraída dos dados. O valor de  $H-d$  é importante pois mede a ‘distância’ entre as simulações das distribuições *a posteriori* e a sua aproximação da distribuição  $\beta$ , podendo ser interpretado como uma porcentagem da não-sobreposição entre essas distribuições. Se  $H-d = 0$ , as distribuições são idênticas e, por outro lado, se  $H-d = 1$ , as distribuições são completamente diferentes.

De acordo com Spiegelhalter et al. (2002), o valor do  $DIC$  pode ser então utilizado na tomada de decisão sobre qual dos quatro modelos descreve melhor o conjunto de dados analisados. O  $DIC$  se utiliza do mesmo espírito do critério de informação de Akaike ( $AIC$ ), melhor conhecido, (ver análise das conexões de Delaunay) no qual se deve avaliar de forma comparativa o resultado de todos os modelos, e deve-se levar em conta o resultado de outras estimativas. O parâmetro  $Dbar$  é uma medida de como o modelo se ajusta aos dados (quanto menor melhor). O  $DIC$  também leva em conta o número aproximado de parâmetros que foram



estimados ( $pD$ ). Os modelos que apresentarem os menores valores do  $DIC$  são os preferidos e as diferenças de menos de 5 ou 6 unidades entre os modelos é muito pequena e não deve ser utilizada para uma tomada de decisão. Embora os modelos com o  $DIC$  menor sejam geralmente preferíveis, o modelo com o melhor ajuste com os dados (baixos valores de  $Dbar$ ) podem ser escolhidos quando as diferenças entre os  $DIC$  são desprezíveis.

### ***Divergência Genética e Padrões Espaciais***

A divergência genética entre as populações foi avaliada com base na matriz de distância genética obtida pela AMOVA, uma metodologia de análise desenvolvida para marcadores dominantes como o RAPD, que é a que apresenta um menor número de pressupostos em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, tamanho amostral e padrão de herança do marcador. De qualquer modo, os resultados das três metodologias utilizadas para estimar a estruturação da variabilidade genética nas populações são convergentes (ver resultados). Após a estimativa da divergência genética, vários métodos multivariados podem ser aplicados. Neste estudo, a matriz de distâncias genéticas foi analisada, inicialmente, a partir de uma análise de agrupamento tipo UPGMA (*unweighted pair-group method by arithmetic averages*), que produz um arranjo hierárquico de classificação das populações, representado por um dendrograma. A representatividade deste dendrograma foi testada por meio da correlação entre as distâncias genéticas originais e as distâncias entre as populações no dendrograma (correlação cofenética).

Apesar de o agrupamento pelo método do UPGMA ser uma das técnicas mais utilizadas neste tipo de estudo, ele tem sido criticado baseado no fato de que os processos evolutivos nem sempre produzem um padrão hierárquico de variação ao nível de população (Lessa 1990; Rodrigues & Diniz-Filho 1998). Este tipo de agrupamento hierárquico pode não

representar adequadamente as distâncias genéticas, indicando um falso arranjo hierárquico entre as populações, quando existe entre elas, de fato, um padrão contínuo ou reticulado.

Em função desses problemas, as distâncias genéticas também foram analisadas por uma técnica de ordenação que visa representar graficamente a dissimilaridade entre as populações. Segundo Lessa (1990) a técnica mais apropriada para este tipo de trabalho é o escalonamento multidimensional não-métrico (*non-metric multidimensional scaling*). Esta técnica parte de uma configuração inicial de pontos (populações) alocados ao acaso em um número reduzido de dimensões, normalmente 2-D ou 3-D. Com base na distribuição ao acaso das populações são calculadas novas distâncias e estas são comparadas com as distâncias genéticas originais, através de um procedimento iterativo, com o objetivo de minimizar as diferenças entre as matrizes. A configuração inicial pode ser aleatória, definindo para cada população um par ordenado X, Y de números aleatórios, ou baseada em escores de outras análises multivariadas, tais como uma análise de componentes principais. Essa minimização é mensurada, ao longo do processo iterativo, por uma estatística denominada *estresse* (S)(Kruskall, 1964), dado por:

$$S = \sqrt{\frac{\sum (d_{ij}^* - \hat{d}_{ij})^2}{\sum (d_{ij}^* - \bar{d}_{ij}^*)^2}}$$

onde  $d_{ij}^*$  são as distâncias entre as populações no espaço de dimensão reduzida,  $\hat{d}_{ij}$  são as distâncias esperadas por um modelo de regressão monotônica das distâncias no espaço de dimensão reduzida sobre as distâncias originais,  $\bar{d}_{ij}^*$  é a distância média no espaço de dimensão reduzida. O somatório é feito ao longo dos pares  $i, j$ , mas com  $i < j$ . Quanto mais próximo de zero for o valor de S, menor a distorção e, portanto, melhor a representatividade das distâncias genéticas. Neste estudo, a matriz inicial de distâncias entre as populações foi estabelecida em um espaço de duas dimensões, definidas aleatoriamente.

A fim de se analisar os padrões de variação espacial em um contexto multivariado, foi inicialmente feita a estimativa do coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) entre as matrizes de distâncias genéticas e as distâncias geográficas entre as populações. O estimador do coeficiente de correlação simples (Epperson 2003), no caso entre duas matrizes  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{Y}$ , é dado por:

$$r = \frac{\sum_{i,j=1}^n x_{ij}y_{ij}}{\sqrt{\sum_{i,j=1}^n x_{ij}^2 \sum_{i,j=1}^n y_{ij}^2}}$$

onde  $x_{ij} = X_{ij} - \bar{X}$  e  $y_{ij} = Y_{ij} - \bar{Y}$ . A significância dessa correlação matricial não pode ser testada pelos testes estatísticos usuais, por apresentar problemas de independência entre os elementos nas matrizes. Nesse sentido, a estatística  $Z$  de Mantel (1967) tem sido freqüentemente utilizada, a fim de se testar a significância da associação entre matrizes contendo diferentes tipos de distâncias entre pares de observações (Smouse et al. 1986; Manly 1997). O valor  $Z$  de Mantel é dado por:

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

onde  $X_{ij}$  e  $Y_{ij}$  são elementos das matrizes  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{Y}$  a serem comparadas (no caso, as matrizes de distância geográfica e genética, respectivamente). A significância do  $Z$  pode ser obtida comparando-se esse valor observado com valores de uma distribuição nula, construída recalculando-se os valores de  $Z$  diversas vezes, aleatorizando, em cada uma delas, a ordem dos elementos de uma das matrizes (Manly 1997). A estatística  $Z$  possui uma relação monotônica com o  $r$  de Pearson calculado entre matrizes (correlação matricial), de modo que ela pode ser utilizada para testar a significância de  $r$  (Manly 1986). Neste trabalho, 5000

permutações aleatórias foram utilizadas para se testar a significância das correlações matriciais.

As correlações matriciais e o teste de Mantel foram também utilizados para avaliar o padrão multivariado de estrutura espacial entre as populações. Foram calculados coeficientes de correlação matricial entre as distâncias genéticas e 5 matrizes de conectividade espacial, com valor 1,00 indicando pares de populações “ligadas”, se a distância geográfica entre elas se encontra em cada uma das classes de distância previamente definidas. Essas classes de distância geográfica foram estabelecidas de modo a manter o mesmo número de conexões entre populações e os seus limites superiores foram (1ª classe 181km; 2ª classe 262km; 3ª classe 364km; 4ª classe 460km e 5ª classe 825km). Assim, é possível relacionar o coeficiente de correlação matricial, cuja significância foi estabelecida pelo teste de Mantel, com o aumento das distâncias geográficas, gerando assim um correlograma multivariado (Sokal et al. 1986).

### ***Análise de descontinuidade genética***

Baseados nas distâncias genéticas um procedimento foi utilizado para acessar a descontinuidade dos dados genéticos no espaço geográfico (Manel et al. 2003; Telles et al. 2003). Para esta análise de descontinuidade, as populações são localizadas em um mapa de acordo com suas posições geográficas relativas e o método de triangulação de Delaunay é utilizado para conectá-las, resultando em uma rede que conecta todas as populações. A rede de Delaunay é formada conectando-se as em conjuntos de três populações (A, B e C), sendo que a ligação entre elas só ocorre se e somente se um círculo passando sobre elas não incluir nenhuma outra população (Figura 8) (Legendre & Legendre 1998).

A partir desta rede de Delaunay e das distâncias genéticas, uma maneira simples de avaliar descontinuidades em dados multivariados é dividir as distâncias genéticas associadas a cada ligação entre as populações ABC na rede de Delaunay pela distância geográfica (Legendre &

Legendre, 1998). Desta forma, obtêm-se uma razão que expressa se as distâncias genéticas seriam altas ou baixas em função das distâncias geográficas. A análise de descontinuidade é feita mapeando-se uma dada proporção (i.e., 25%) dos valores mais elevados da distribuição global dessas razões ao longo da rede de Delaunay (Legendre & Legendre 1998; Manel et al. 2003).



**Figura 8.** Rede de Delaunay formando conexões entre as 18 populações de *P. cuvieri* estudadas.

## ***Associação do padrão espacial da variabilidade genética à história da ocupação humana na região do Cerrado***

### *Comparações Matriciais*

A matriz de distância genética obtida pela AMOVA foi utilizada para realização de testes de Mantel comparando-a com as matrizes que foram construídas para diferentes variáveis ambientais e sócio-econômicas, ou combinações destas, por município. Estas variáveis tentam capturar informações relevantes sobre as localidades, tais como condições climáticas, características de ocupação humana, de desenvolvimento sócio econômico regional e as condições de preservação da paisagem nestas áreas (Diniz, 1984; Galinkin, 2003). As variáveis sócio-econômicas utilizadas nesta análise foram obtidas nos últimos censos agropecuário (dados referentes a 1995-1996) e demográfico (dados referentes a 2000) do IBGE (IBGE, 1997, 2001) e no PNUD (2003). Os dados climáticos são oriundos de diversas fontes e compilados e distribuídos pelo “*Atlas of the Biosphere*” (2002), em resoluções variando de 0,083 a 0,5° de latitude/longitude, dependendo da variável. Esses dados estão disponíveis em formato de 'grid' em arquivo padrão do *ArcView* e, para este estudo, foram obtidos para a célula da grid que contém as coordenadas de cada localidade analisada. A situação da paisagem no Estado de Goiás (fragmentação) foi obtida por dados coletados recentemente pelo WWF/CI no contexto do projeto para definição de áreas prioritárias para Goiás (SEMARH 2004). Essas 38 variáveis estão listadas abaixo:

#### ➤ *Agricultura*

- Porcentagem de estabelecimentos rurais com área < 100 ha (ESTAB);
- Porcentagem de estabelecimentos que usam adubos e corretivos (ADUBOS);
- Porcentagem da área do município ocupada com plantações de arroz (ARROZ);
- Densidade de bovinos (numero de cabeças / hectare) (BOVINO);
- Porcentagem dos estabelecimentos que usam curva de nível (CURVA DE NÍVEL);
- Porcentagem dos estabelecimentos que usam técnicas de controle de pragas (PRAGAS);

- Porcentagem das despesas gastas com inovações tecnológicas associadas à agricultura, incluindo uso de adubação, fertilizantes, maquinário, etc. (DESPESAS);
- Porcentagem de estabelecimentos com energia elétrica (ELETRICIDADE);
- Porcentagem de estabelecimentos que utilizam irrigação (IRRIGAÇÃO);
- Porcentagem da área municipal ocupada por lavouras (LAVOURAS);
- Porcentagem da área municipal ocupada por matas naturais e plantadas (MATAS);
- Porcentagem da área do município ocupada com plantações de milho (MILHO);
- Porcentagem de estabelecimentos que utilizam maquinário agrícola (MAQUINARIA);
- Porcentagem da área municipal ocupada por pastagens (PASTAGEM);
- População rural (relativa à população total, 2000);
- Porcentagem da área do município ocupada com plantações de soja (SOJA);
- Valor total (R\$) da produção animal (VALOR ANIMAL);
- Valor total (R\$) da produção vegetal (VALOR VEGETAL);

➤ *Variáveis Ambientais e Climáticas*

- Evapotranspiração real (EVAP);
- Precipitação anual total (PREC);
- Elevação (ELEVAÇÃO);
- Produtividade primária líquida (NPP);
- Evapotranspiração potencial (PET);
- Temperatura máxima anual (TMAX);
- Temperatura média (TMED);
- Temperatura mínima (TMIN);

➤ *Fragmentação*

- Área dos fragmentos por município (AF);
- Número de fragmentos por município (NF);

➤ *Sócio-Econômicas*

- Ano de Instalação do Município (ANO);
- Densidade demográfica, habitantes por km<sup>2</sup>, em 2000 (DENS);
- Índice de desenvolvimento humano municipal (IDH Municipal), educação -(IDHM-EDU);

- Índice de desenvolvimento humano municipal (IDH Municipal), longevidade -(IDHM-LONG);
- Índice de desenvolvimento humano municipal (IDH Municipal), renda -(IDHM-REND);
- Índice de desenvolvimento humano municipal (IDH Municipal), global -(IDHM-EDU);
- População humana total, em 2000 (POP);
- População urbana em 2000 (POPURB);
- Renda per capita em 2000 (REND);
- Fecundidade (FECUND).

A fim de estimar as correlações matriciais dessas variáveis com as distâncias genéticas ( $\Phi_{ST}$ ) foram construídas matrizes de diferença par a par entre as localidades. Para a análise de conjuntos dessas variáveis (por exemplo, sócio-econômicas), as matrizes foram definidas por um coeficiente de distância Euclidiana entre as localidades, após a padronização (média = 0 e variância = 1) das variáveis (Sneath e Sokal, 1973).

#### *Correlações ao longo da rede de Delaunay*

Entretanto, uma inspeção visual dos resultados obtidos pela análise de descontinuidade genética, em relação ao padrão de fragmentação da paisagem (remanescentes), sugere que as distâncias genéticas podem ser mais bem explicadas não por diferenças nos valores de variáveis sócio-econômicas, mas sim pelo valor absoluto de cada uma delas. Por exemplo, uma divergência genética relativamente elevada entre duas populações próximas no espaço geográfico pode ocorrer se ambas estiverem em uma região altamente fragmentada, na qual as diferenças entre os níveis de fragmentação mensurados em escala local tendam a zero. Nesse sentido, o teste de Mantel, tal qual realizado anteriormente, falharia em detectar uma relação entre divergência genética e fragmentação.

A fim de mensurar a complexidade dessas relações, os valores de algumas variáveis mais ligadas ao processo de fragmentação foram obtidos nos municípios que se encontram ao



longo de cada uma das conexões geradas pela triangulação de Delaunay (ver Apêndice 3).

Essas variáveis foram:

- Distâncias geográficas, em escala logarítmica (G);
- Ano médio de instalação dos municípios (A);
- População humana no ano 2000, em escala logarítmica (P);
- Renda per capita (R);
- Número de municípios ao longo da conexão de Delaunay (NM);
- Número de fragmentos naturais (NF);
- Área dos fragmentos naturais (AF).

A escolha dessas variáveis está baseada inicialmente em um processo natural de isolamento-por-distância (G), reforçado por efeitos antrópicos históricos que perturbariam esse isolamento natural (A). Entretanto, especialmente na região centro-oeste, esses processos históricos de ocupação humana só devem ter passado a ter importância quando o tamanho das populações humanas (P) e o seu desenvolvimento econômico (R) atingiram níveis relativamente elevados e que passaram a causar, de fato, uma maior fragmentação na paisagem natural (NF e AF). Os valores médios e/ou somas desses dados sócio-econômicos ao longo das conexões foram a seguir pareados com as distâncias genéticas em cada uma delas.

A fim de explicar as distâncias genéticas ao longo das conexões com base nessas variáveis, foi adotada uma metodologia de escolha de modelos se baseia nos princípios da teoria da informação (Burham & Anderson, 2002), utilizando o critério de Akaike (*Akaike information criterion*, AIC). Devido ao elevado número de modelos potenciais envolvendo os sete preditores, foram selecionados alguns modelos para análise, além do modelo saturado (com todos os preditores):

- 1) G + A + P + R + NM + NF + AF (Modelo saturado);
- 2) G + A
- 3) G + A + P
- 4) G + A + P + R
- 5) G + A + P + R + NM
- 6) NF + AF
- 7) NF + AF + P
- 8) NF + AF + P + NM
- 9) NF + AF + P + NM + R
- 10) NF + AF + G + A
- 11) P + R + NM
- 12) P + A

Para cada um desses modelos, calculou-se o valor de AIC corrigido para pequenas amostras, dado por

$$AIC_C = n \log(\sigma^2) + 2K \left( \frac{n}{n - K - 1} \right)$$

Onde

$$\sigma^2 = \frac{\sum \varepsilon_i^2}{n}$$

Sendo que  $\varepsilon_i$  é o  $i$ -ésimo resíduo do modelo,  $n$  é o número de conexões e  $K$  é o número de parâmetros do modelo (incluindo o intercepto e o  $\sigma^2$ ). Quanto menor o valor de  $AIC_C$  mais explicativo é o modelo. As diferenças entre os valores de Akaike em relação ao modelo mais explicativo são dadas por

$$\Delta_i = AIC_C - AIC_{C(MINIMO)}$$

Valores de  $\Delta_i$  maiores que 2 indicam que o modelo é pouco plausível, considerando os dados disponíveis. Esses valores são usados ainda para calcular os pesos de cada modelo ( $w_i$ ) que permitem a escolha entre modelos, por meio de uma relação não-linear com o delta, dado por:

$$w_i = \frac{e^{\frac{1}{2}\Delta_i}}{\sum e^{\frac{1}{2}\Delta_i}}.$$

Valores de  $w_i$  indicam a importância relativa do modelo  $i$  em relação a todos os modelos avaliados. A soma ou média dos valores de  $w_i$  nos modelos que contém cada uma das variáveis também pode ser utilizada para definir a importância relativa de cada uma delas no total dos modelos analisados.

### ***Definição de Unidades Operacionais para a conservação da variabilidade genética***

Segundo Diniz-Filho & Telles (2002), populações locais (amostras) distantes entre si a uma distância geográfica menor do que o intercepto do correlograma podem ser consideradas como Unidades Operacionais, ou seja, unidades genéticas que seriam independentes para a conservação da variabilidade genética. Isso porque populações situadas a distâncias menores seriam de certo modo redundantes do ponto de vista da variabilidade genética. Esse procedimento pode ser aplicado de forma bem sucedida se o correlograma espacial indicar processos estacionários na estrutura espacial da variabilidade genética, como por exemplo, um perfil de estabilização seguindo um modelo de isolamento por distância ou “alpondras” (Telles et al. 2003). Nessa situação de isolamento por distância ou “alpondras”, o perfil do correlograma é menos dependente da configuração espacial da amostragem das populações (ver Fenster et al., 2003; Vekemans & Hardy, 2004).

Neste trabalho esse procedimento foi aplicado a fim de discutir, com base no correlograma de Mantel, quantas unidades operacionais seriam necessárias para conservar a variabilidade genética medida pelos marcadores RAPD para *P. cuvieri* no Estado de Goiás. A eficiência desse conjunto reduzido de populações, no sentido de representar efetivamente a variabilidade genética, foi avaliada pela proporção de Unidades Operacionais que contém pelo menos um indivíduo com bandas para todos os locos RAPD.

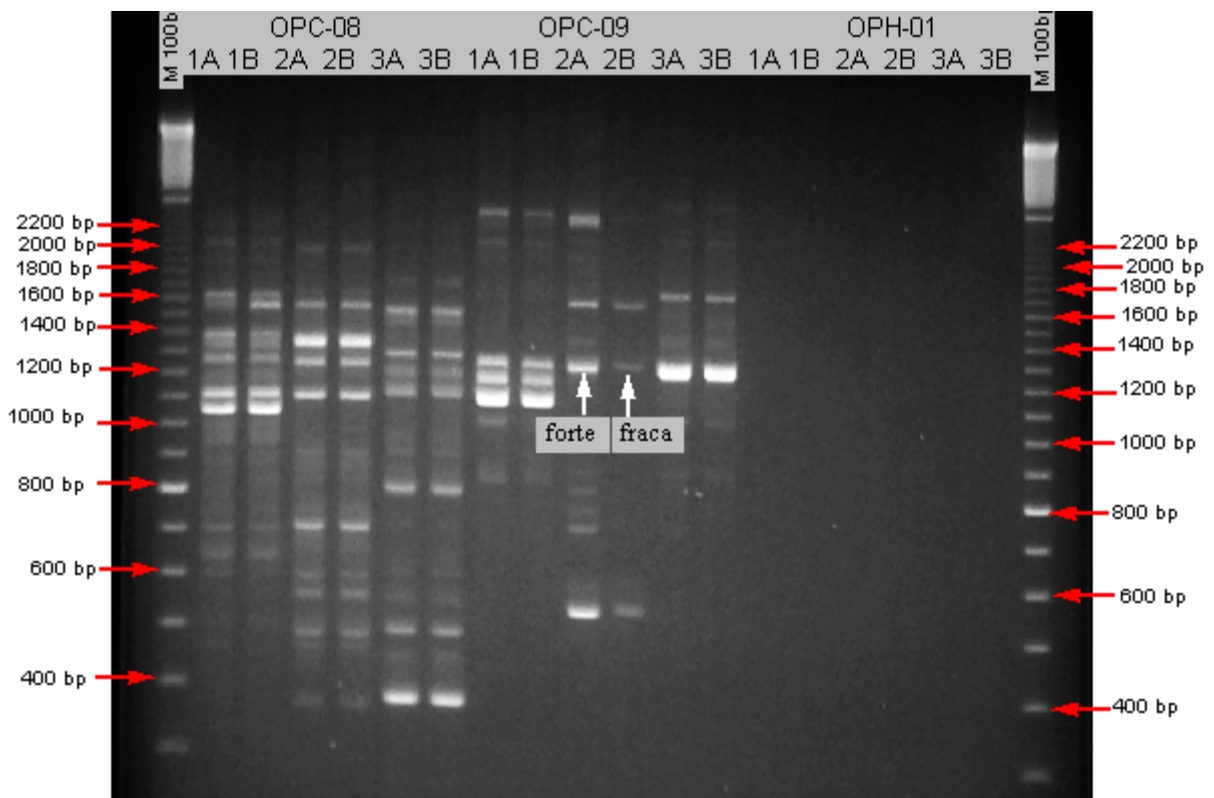
### ***Softwares utilizados nas análises***

Para o cálculo das estatísticas descritivas e para a análise de variância de frequências alélicas foi utilizado o software TFGA 1.3 (*Tools For Population Genetic Analyses*) (Miller 1997). As análises de divergência genética multivariadas (UPGMA e NMDS) e os testes de Mantel foram realizadas utilizando o pacote NTSYS 1.5 (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*) (Rohlf 1989). A Análise de Variância Molecular foi realizada utilizando os softwares AMOVAPREP e AMOVA 1.55 (Excoffier 1993). A estimativa do  $\theta^B$ , via estatística Bayesiana foi feita utilizando o software HICKORY v. 1.0 (Holsinger & Lewis, 2003). As demais análises estatísticas foram feitas no SYSTAT/SYGRAPH v.10.0 (Browne & Mels 2000).

## RESULTADOS

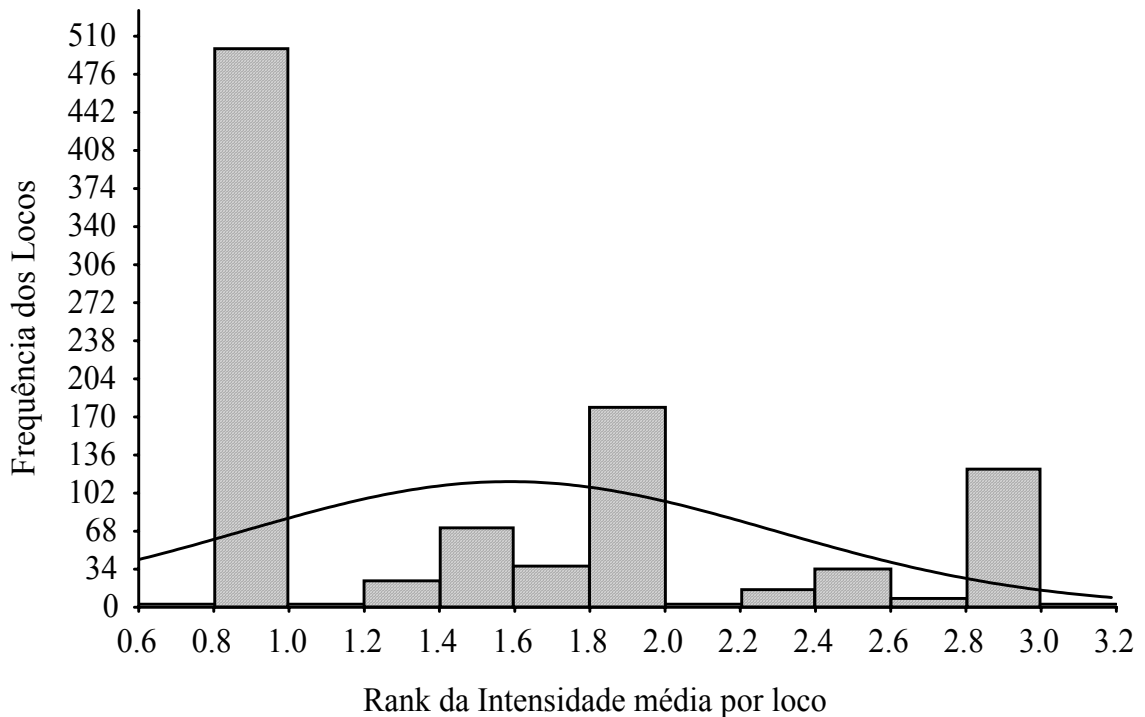
### *Análise de repetibilidade e seleção dos primers RAPD*

Dos 60 *primers* testados, 52 apresentaram um padrão de amplificação possível de ser codificado. Estes *primers* forneceram uma média de 19 locos, com um mínimo de 7 e máximo de 31 locos. Do total de locos (996) apenas 9,4% (105) não repetiram, sendo que por *primer* este valor variou entre 0% e 56%. A repetibilidade por *primer* não está correlacionada ao número de locos ( $rs = 0,024$ ;  $P = 0,864$ ). É importante ressaltar que existe uma variação na intensidade de banda em um mesmo loco, uma variável que deve ser considerada no momento de descarte de um determinado loco (Figura 9). Este fato deve ocorrer devido à sensibilidade da reação de PCR a pequenas mudanças nas condições de amplificação de uma repetição para outra.



**Figura 9.** Fragmentos RAPD amplificados dos *primers* OPC-08, OPC-09 e OPH-01 com três indivíduos de *Physalaemus cuvieri*. As colunas “M 100bp” indicam o marcador de peso molecular (100 base pair ladder, Pharmacia). Estão representadas as diferenças de intensidade na repetição de um determinado loco.

A frequência dos locos RAPD, considerando as diferentes intensidades de bandas, está representada na figura 10, na qual é possível observar que a maioria dos locos apresenta uma intensidade baixa. A análise de repetibilidade total, feita por faixa de intensidade, mostrou que a intensidade (1) repetiu 85%, a (2) 91% e a (3) 99%, sendo os intervalos de confiança para estas estimativas iguais a [81% – 89%], [87% – 95%] e [95% – 99%], respectivamente. Independente da intensidade de banda existiu uma frequência de repetibilidade alta nos três indivíduos analisados, mostrando que mesmo as bandas com intensidade fraca apresentam um alto índice de repetibilidade (Figuras 11).

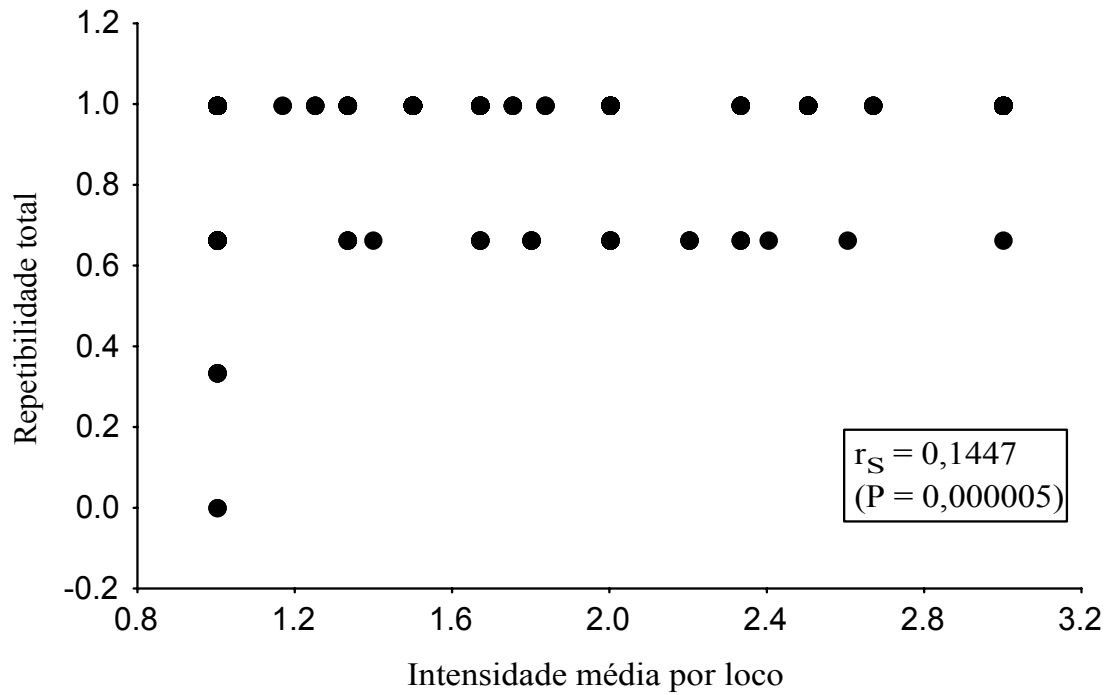


**Figura 10.** Distribuição de frequência do rank da intensidade média por loco RAPD, em amostras de *physalemus cuvieri*.

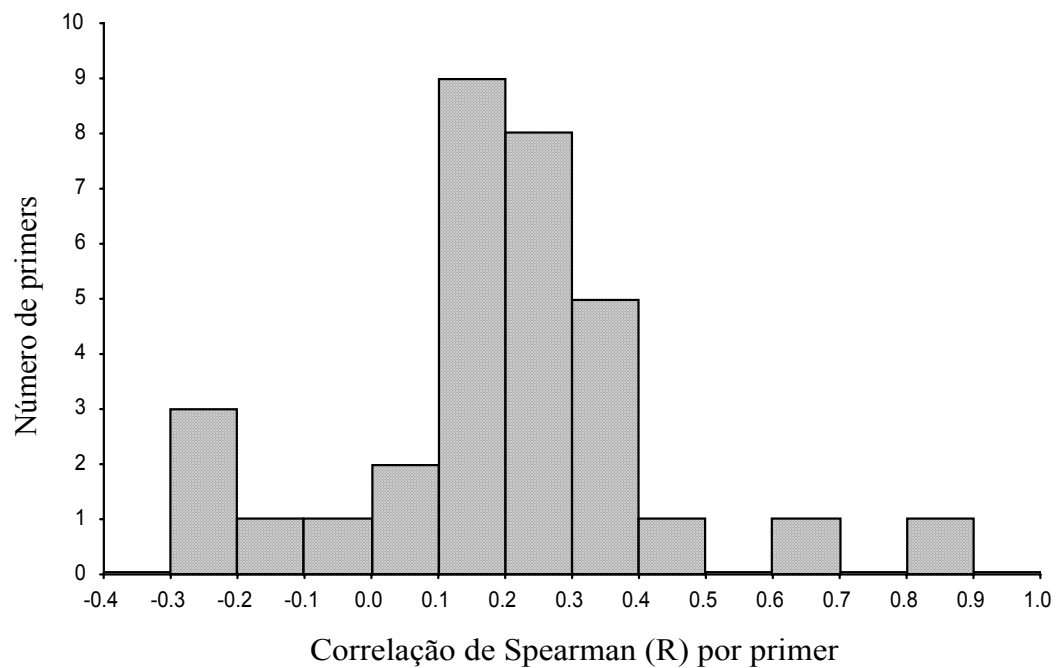
A correlação entre intensidade e repetibilidade foi igual 0,14 (Figura 12), variando entre -0,26 e 0,82, por primer, sendo a maioria das correlações positivas (Figura 13). Dos 52 locos obtidos 20 apresentaram uma proporção de locos que repetem de 100%, 13 uma proporção de 90%, 9 uma proporção de 80%, 5 uma proporção de 70%, 2 uma proporção de 60%, 2 uma proporção de 50% e 1 uma proporção de 40% de repetibilidade (Figura 14). Conclui-se que a repetibilidade do marcador é consideravelmente alta, mesmo levando-se em conta bandas com baixa intensidade, confirmando o potencial do uso deste marcador em estudos de caracterização da variabilidade genética de populações.



**Figura 11.** Frequência dos locos RAPD considerando quatro classes de repetibilidade, 0 (não repetiu), 1 (repetiu apenas em um indivíduo), 2 (repetiu em dois indivíduos) e 3 (repetiu nos três indivíduos), em amostras de *physalaemus cuvieri*.

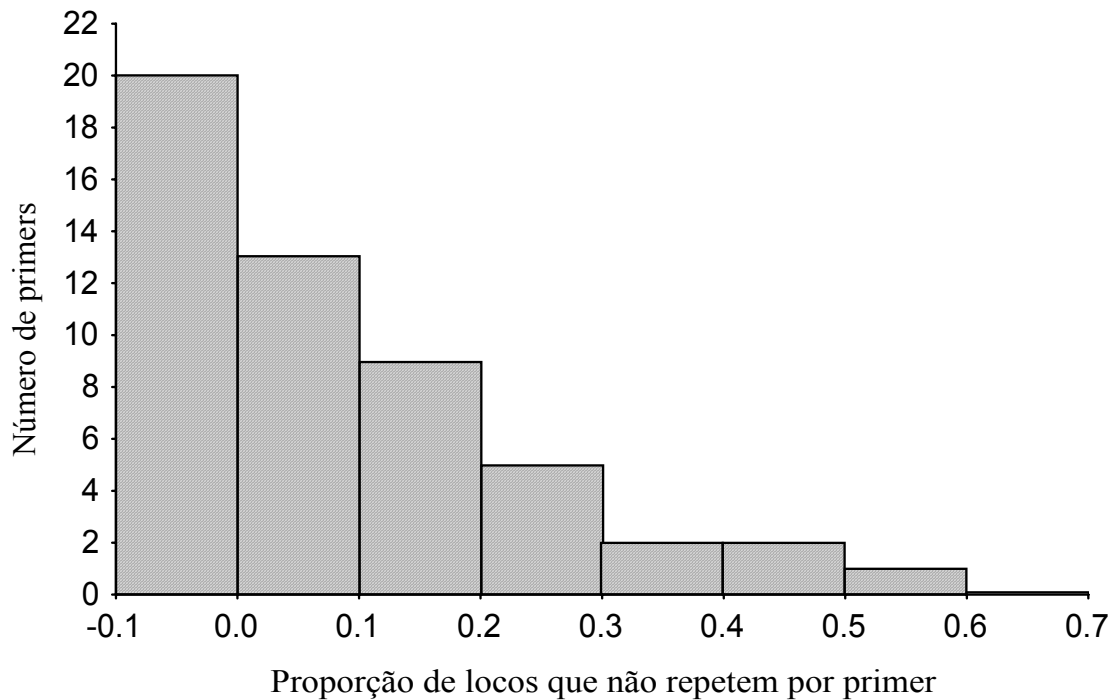


**Figura 12.** Correlação de Spearman entre a repetibilidade total e a intensidade média por loco RAPD, em amostras de *Physalaemus cuvieri*.



**Figura 13.** Distribuição de freqüência do número de *primers* em relação à correlação da repetibilidade total e a intensidade média por loco RAPD, em amostras de *Physalaemus cuvieri*.





**Figura 14.** Distribuição de freqüência do número de *primers* em relação à proporção de locos RAPD que não repetem considerando cada *primer*, em amostras de *Physalaemus cuvieri*.

Com base na avaliação detalhada de todas as análises feitas com os 52 primers que amplificaram, foram selecionados os nove primers de RAPD que apresentaram o melhor desempenho, tanto do ponto de vista de repetibilidade quanto de resolução das bandas no gel para, em seguida, serem utilizados na avaliação da estrutura genética das 18 populações de *P. cuvieri*.

#### ***Variabilidade genética dentro e entre populações***

De uma maneira geral as populações de *Physalaemus cuvieri* apresentam uma considerável variabilidade genética que foi observada para os nove *primers* de RAPD selecionados (Tabela 4; ver arquivo \*.nex no Apêndice 2). O número de locos, por primer, variou entre 4 e 17, totalizando 126 locos nas 18 populações. A proporção de locos polimórficos variou entre 81% e 94% nas populações, com um valor global de 97%. A

diversidade genética ou heterozigose esperada foi relativamente alta e não variou muito entre as populações, alcançando valores entre 0,318 e 0,389 nas populações, com um valor global de 0,408 (Tabela 5).

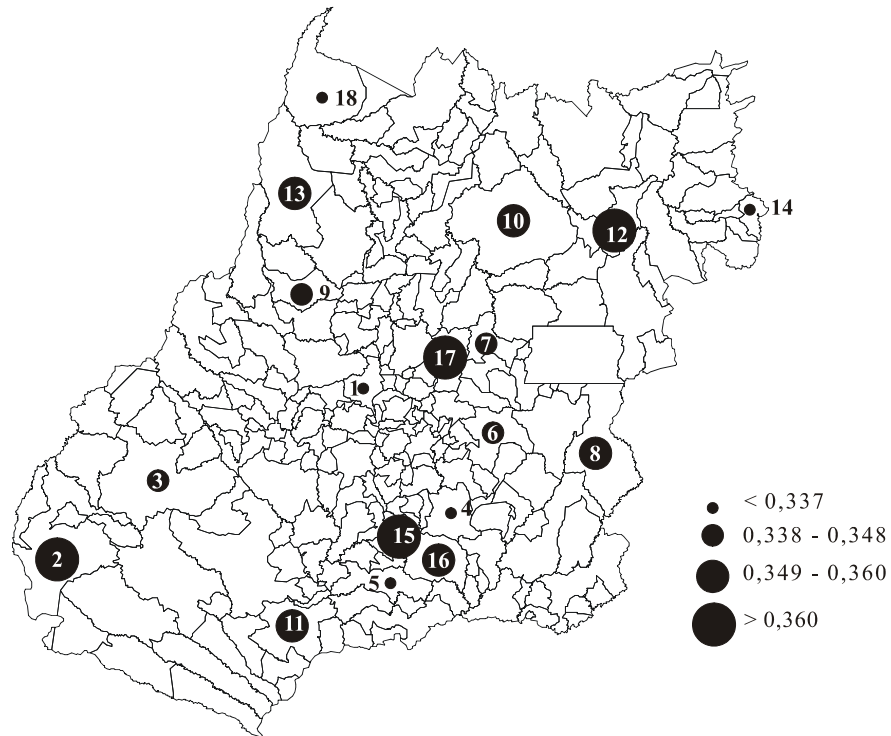
**Tabela 4.** Relação dos *primers*, suas seqüências de bases e o número de locos (NL), obtidos nas 18 populações de *Physalaemus cuvieri*.

<b>primer</b>	<b>seqüência 5' para 3'</b>	<b>NL</b>
<b>A-07</b>	<b>G A A A C G G G T G</b>	<b>17</b>
<b>A-08</b>	<b>G T G A C G T A G G</b>	<b>17</b>
<b>A-13</b>	<b>C A G C A C C C A C</b>	<b>14</b>
<b>A-20</b>	<b>G T T G C G A T C C</b>	<b>4</b>
<b>C-05</b>	<b>G A T G A C C G C C</b>	<b>17</b>
<b>C-08</b>	<b>T G G A C C G G T G</b>	<b>19</b>
<b>C-20</b>	<b>A C T T C G C C A C</b>	<b>14</b>
<b>H-04</b>	<b>G G A A G T C G C C</b>	<b>13</b>
<b>H-05</b>	<b>A G T C G T C C C C</b>	<b>10</b>

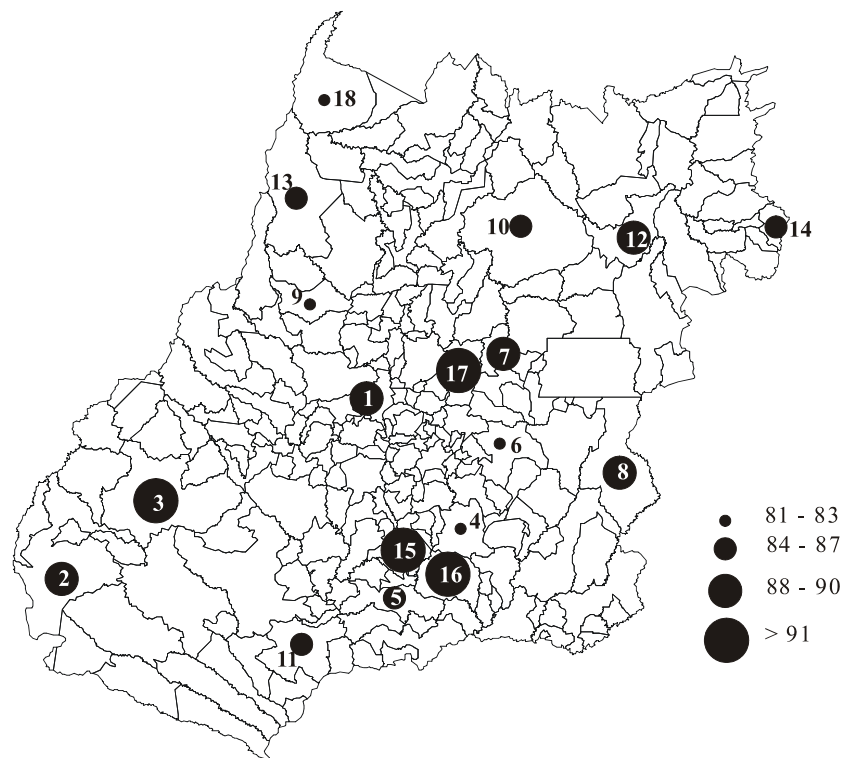
Como base no mapeamento das estimativas de variabilidade genética dentro das populações foram levantados possíveis cenários para a explicação do padrão atual de variabilidade encontrado em cada uma das populações desta espécie. Embora não haja um padrão espacial claro da variabilidade intrapopulacional é possível destacar alguns conjuntos de populações que apresentam mais variação. Pôde-se perceber que na região Sudeste de Goiás encontram-se algumas populações que possuem maior heterozigose, particularmente em Morrinhos (16) e Pontalina (15) (Figura 15). Com relação ao número de locos polimórficos, essas mesmas populações são mais variáveis, assim como a de Pirenópolis (17) (Figura 16). Quanto ao componente de variância intrapopulacional, obtido pela AMOVA (ver a seguir), nota-se que as populações de Pontalina (15) e Pirenópolis (17) são mais variáveis e também estão na região sudeste (Figura 17).

**Tabela 5.** Relação com o tamanho amostral médio (TM), heterozigosidade (h) e porcentagem de locos polimórficos (LP), por população de *Physalaemus cuvieri*.

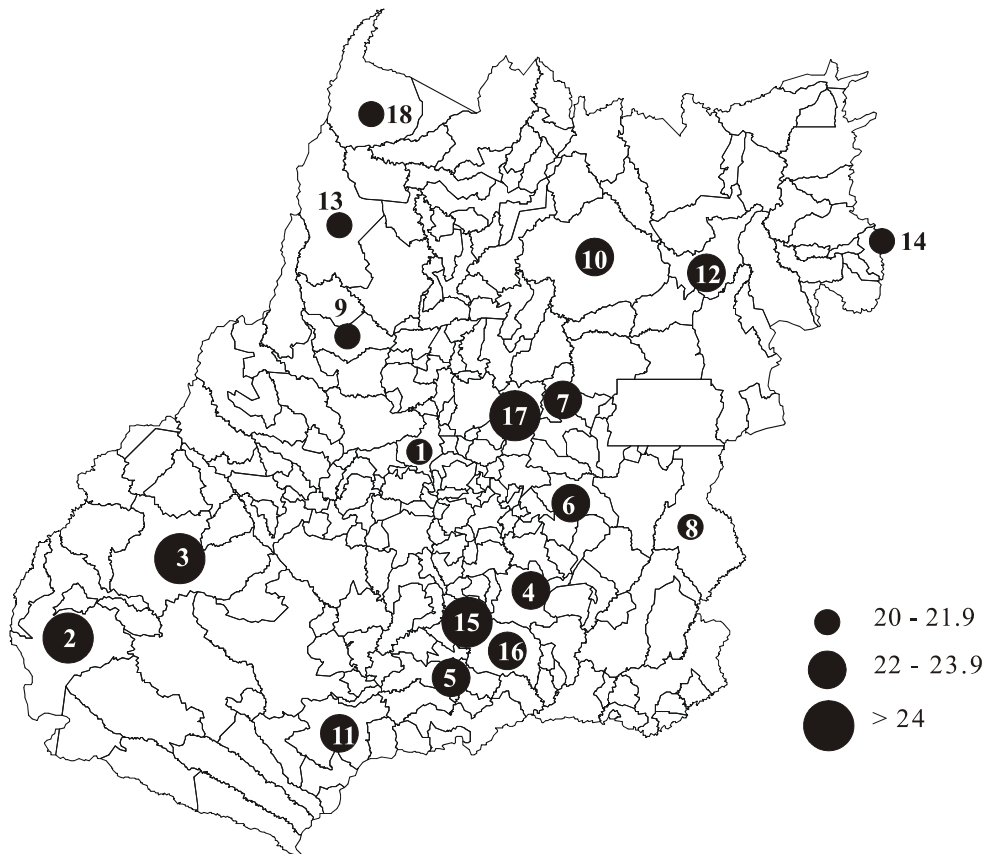
	<b>População</b>	<b>TM</b>	<b>h</b>	<b>LP (%)</b>
1	Itaberaí	7,9	0,337	90
2	Mineiros	10,0	0,363	90
3	Caiapônia	8,9	0,348	91
4	Piracanjuba	8,3	0,337	87
5	Goiatuba	9,4	0,346	83
6	Silvânia	7,0	0,342	89
7	Cocalzinho de Goiás	11,0	0,360	90
8	Cristalina	9,9	0,342	81
9	Araguapaz	9,8	0,351	85
10	Niquelândia	10,0	0,358	87
11	Quirinópolis	23,0	0,369	90
12	São João d'Aliança	11,8	0,356	87
13	Nova Crixás	10,6	0,337	83
14	Mambaí	6,5	0,318	84
15	Pontalina	20,7	0,389	94
16	Morrinhos	6,5	0,353	92
17	Pirenópolis	19,3	0,376	94
18	São Miguel do Araguaia	14,8	0,324	83
	Geral	214,6	0,408	97



**Figura 15.** Distribuição espacial dos valores de heterozigose nas 18 populações de *Physalaemus cuvieri*.

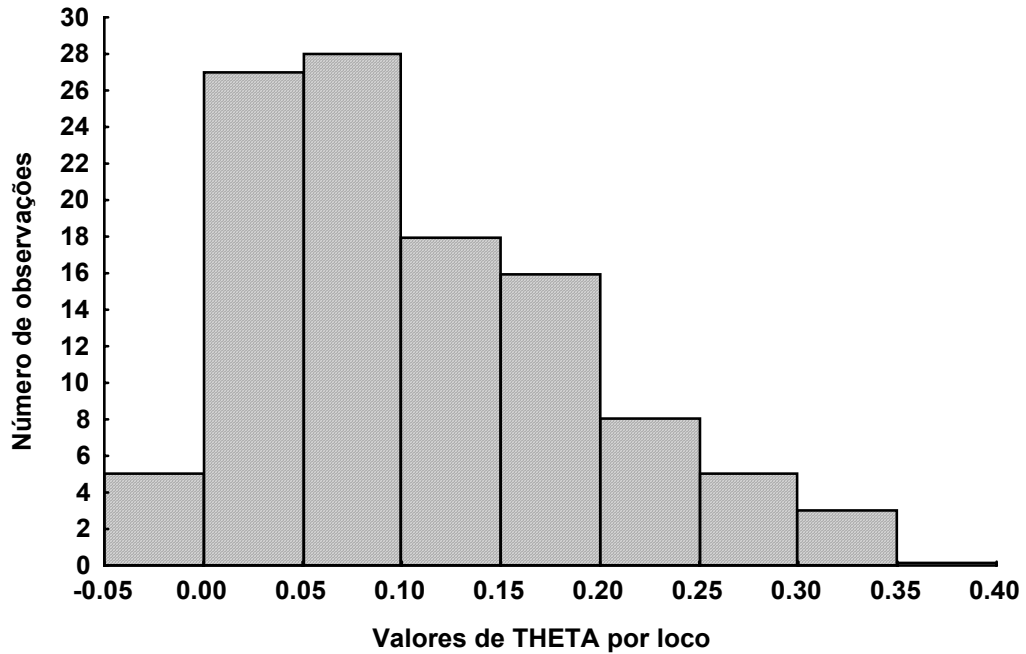


**Figura 16.** Distribuição espacial dos valores de Proporção de Locos polimórficos nas 18 populações de *Physalaemus cuvieri*.



**Figura 17.** Distribuição espacial dos valores das Variâncias dentro das populações com base na AMOVA nas 18 populações de *Physalaemus cuvieri*.

A primeira metodologia utilizada para a avaliação da estruturação da variabilidade genética nas populações foi a análise de variância de freqüências alélicas, realizada a partir das freqüências corrigidas (Lynch & Milligan 1994). Esta análise mostrou que a variabilidade genética está estruturada nas populações com um valor de  $\theta$  global igual a 0,1085 (0,0941 - 0,1235 / IC 95%, com 5000 permutações). Os valores de  $\theta$  para cada loco variaram entre 0,0 e 0,3246, mostrando que existe um comportamento diferenciado da estruturação da variabilidade nos diferentes locos analisados (Figura 18).



**Figura 18.** Distribuição dos valores de  $\theta$  dos 126 locos analisados nas populações de *Physalaemus cuvieri*.

A segunda metodologia utilizada para a avaliação da estruturação da variabilidade genética, a AMOVA (Tabela 6), forneceu uma estimativa global de  $\Phi_{ST} = 0,101$  ( $P < 0,0002$ , com 5000 permutações), de modo que 89.86% da variância genética está no componente intrapopulacional. O valor do  $\Phi_{ST}$ , para os pares de população, variou entre 0,0121 e 0,1747 (Tabela 7). Considerando a escala geográfica em estudo (maior distância igual a 845,1 km), mesmo populações que estão próximas geograficamente já apresentam uma considerável divergência genética, como é o caso dos seguintes pares de populações: Nova Crixás (13) e São Miguel do Araguaia (18) com  $\Phi_{ST}$  igual a 0,142; Cristalina (8) e Morrinhos (16) com  $\Phi_{ST}$  igual a 0,170; Cristalina (8) e Pontalina (15) com  $\Phi_{ST}$  igual a 0,131; Pontalina (15) e Itaberai (1) com  $\Phi_{ST}$  igual a 0,127; Pontalina (15) e Caiapônia (3) com  $\Phi_{ST}$  igual a 0,131.

**Tabela 6.** Quadro de Análise de Variância Molecular para as 18 populações de *Physalaemus cuvieri*, com base em 126 locos RAPD.

Fonte de Variação	Grau de Liberdade	Soma de Quadrado	Quadrado Médio
População	17	984,73	57,92
Indivíduo	196	4872,99	24,86
Total	213	5857,7196	

**Tabela 7.** Valores de  $\Phi_{ST}$  par a para entre as 18 populações de *Physalaemus cuvieri*, com base em locos RAPD.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	****																	
2	0.060	****																
3	0.061	0.025	****															
4	0.097	0.061	0.054	****														
5	0.080	0.053	0.050	0.014	****													
6	0.108	0.091	0.062	0.082	0.093	****												
7	0.089	0.090	0.030	0.085	0.089	0.038	****											
8	0.144	0.094	0.111	0.114	0.122	0.105	0.116	****										
9	0.071	0.100	0.085	0.127	0.128	0.098	0.037	0.145	****									
10	0.096	0.101	0.088	0.120	0.109	0.109	0.092	0.154	0.094	****								
11	0.116	0.085	0.088	0.109	0.122	0.115	0.092	0.111	0.115	0.123	****							
12	0.170	0.095	0.084	0.122	0.150	0.134	0.102	0.129	0.116	0.100	0.058	****						
13	0.123	0.096	0.091	0.121	0.147	0.132	0.119	0.126	0.106	0.123	0.052	<b>0.012</b>	****					
14	0.147	0.071	0.084	0.080	0.112	0.111	0.075	0.118	0.089	0.101	0.063	0.042	0.044	****				
15	0.127	0.095	0.121	0.101	0.130	0.116	0.118	0.131	0.151	0.108	0.116	0.094	0.109	0.103	****			
16	0.095	0.067	0.057	0.077	0.104	0.081	0.086	0.170	0.109	0.130	0.101	0.089	0.094	0.065	0.110	****		
17	0.063	0.052	0.044	0.078	0.088	0.069	0.067	0.109	0.079	0.109	0.087	0.056	0.058	0.074	0.088	0.034	****	
18	0.132	0.145	0.136	0.151	0.159	0.160	0.146	0.171	0.140	<b>0.175</b>	0.142	0.147	0.142	0.156	0.160	0.130	0.067	****

A terceira metodologia de avaliação da estruturação da variabilidade genética utiliza-se de estatística bayesiana para estimar os parâmetros descritores desta variação. Dos quatro modelos obtidos por esta análise (Tabela 8), o que apresentou menor valor de DIC e Dbar foi o “full model” (DIC = 8943,9 e Dbar = 7800,08), no qual o valor do  $\theta^B$  foi igual a 0,103 (intervalo de confiança a 95% igual a 0,094 – 0,0113) (Figura 19). Neste modelo, contudo, o valor de  $f$  é extremamente alto ( $f = 0,969$ ), provavelmente devido a um artefato gerado pelo pequeno número de indivíduos em algumas populações e o elevado número de locos (Holsinger & Lewins, 2003). O modelo que assume  $f = 0$  é o segundo melhor de acordo com o

DIC e o Dbar (9001,0 e 7820,17, respectivamente), com um valor de  $\theta^B = 0,067$ , mas este modelo é somente um pouco melhor do que o que permite a variação no valor de  $f$ , no qual o  $\theta^B$  foi igual a 0,092 e  $f = 0,499$  (DIC = 9088,2 e Dbar = 7878,60). O modelo menos explicativo é o que assume que o  $\theta^B$  é igual a zero (DIC = 10592,8 e Dbar = 10468,41). A confirmação destes resultados aparece quando se analisa qual dos quatro modelos apresenta mais consistência na estimativa dos parâmetros  $f$  e  $\theta^B$  (Tabela 9). Pode-se perceber que, para a estimativa de  $f$ , no “*full model*” o valor de  $I_e$  é o maior e distância (H-d) é a menor. No entanto, o valor do  $f$  neste modelo parece ser irrealisticamente alto, o que pode ser atribuído a tamanho amostral relativamente pequeno em algumas populações aliado a um grande número de locos analisados (Holsinger & Lewis, 2003). De qualquer modo o  $\theta^B$ , que é o parâmetro de maior interesse parece ser estável entre os modelos. Neste caso, apesar do modelo onde  $f = 0$  apresentar o maior valor de  $I_e$ , é razoável pressupormos que na natureza o  $f \neq 0$ , neste caso, portanto, o modelo escolhido mais uma vez seria o “*full model*”, lembrando que o valor de  $f$  deve estar sobreestimado. Pode-se perceber que estes resultados de divergência populacional também estão de acordo com as outras duas estimativas de estruturação da variabilidade genética ( $\Phi_{ST}$  e  $\theta$ ), sugerindo um componente de variação entre populações é significativo e gira em torno de 10%, embora permaneça a incerteza sobre os níveis de endogamia nas populações.

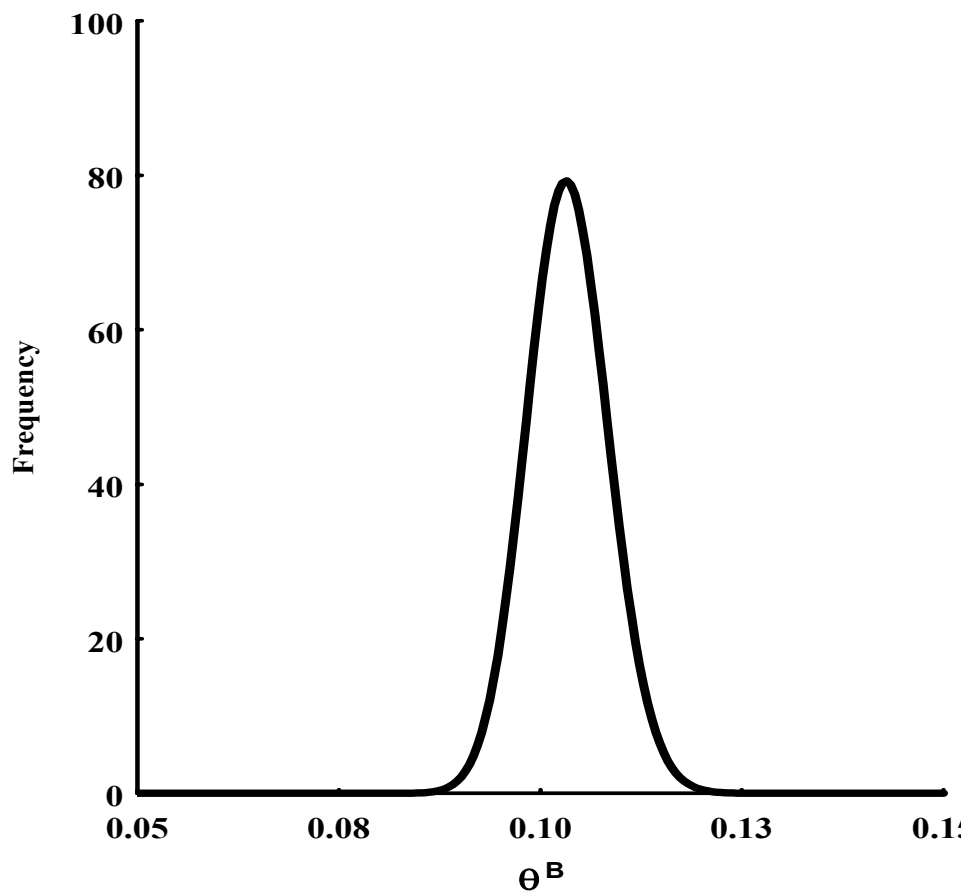
**Tabela 8.** Resultados da análise bayesiana de divergência entre as 18 populações de *P. cuvieri*, incluindo os modelos testados, as estimativas de  $f$ ,  $\theta^B$ , ajuste do modelo (Dbar) e “*Deviant Information Criterion*” (DIC).

Modelo	$f$	$\theta^B$	Dbar	DIC
<i>full</i>	0,969	0,103	7800,08	8943,9
$f = 0$	0	0,068	7820,17	9001,0
$\theta^B = 0$	0,946	0	10468,41	10592,8
<i>free f</i>	0,499	0,092	7878,60	9088,2



**Tabela 9.** Resultados da análise bayesiana de divergência entre as 18 populações de *P. cuvieri*, incluindo as estimativas de  $f$ ,  $\theta^B$ , a medida da informação  $I_e$  e a distância H-d entre a distribuição *a posteriori* e uma distribuição  $\beta$ , para os quatro modelos testados.

Modelo	<i>full</i>		$f = 0$		$\theta^B = 0$		free $f$	
	$I_e$	H-d	$I_e$	H-d	$I_e$	H-d	$I_e$	H-d
$f$	2,49209	0,00170	-	-	1,94586	0,00178	0,00001	0,00208
$\theta^B$	3,87334	0,00126	4,1349	0,00149	-	-	3,30298	0,00382

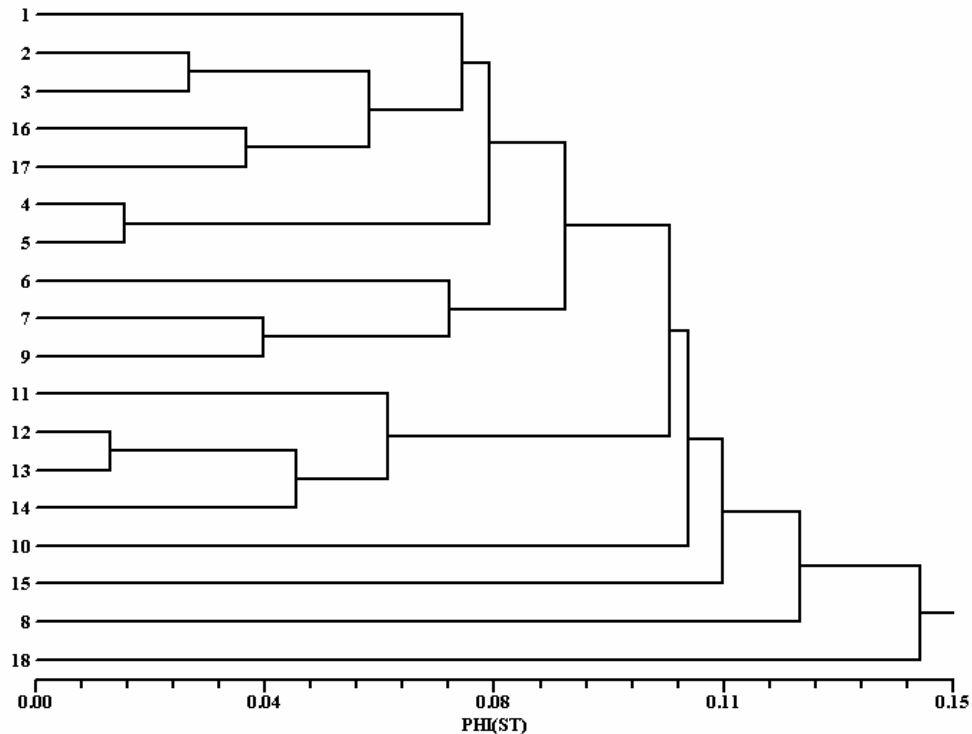


**Figura 19.** Distribuição *a posteriori* do  $\theta^B$ , aproximada para uma distribuição beta com os parâmetros  $\alpha = 378,5$  e  $\beta = 3280,7$ .

### *Padrões espaciais da divergência genética das populações*

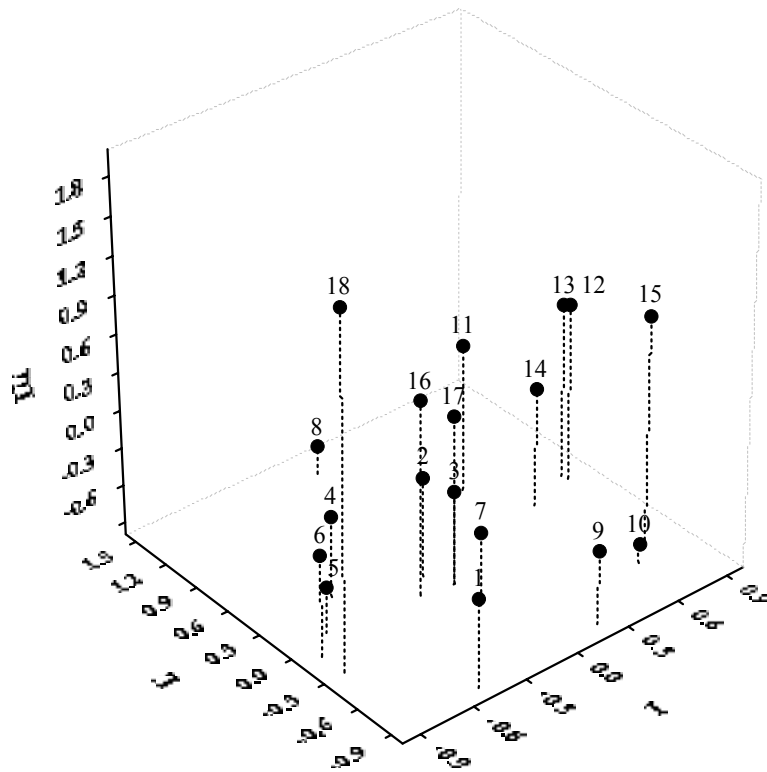
A partir das análises de variabilidade genética entre e dentro das populações descritas anteriormente pode-se observar que existe diferenciação significativa entre as populações. Outra informação importante é a verificação de como a variabilidade genética encontrada está estruturada no espaço, o que foi avaliado a partir de análises multivariadas.

As distâncias genéticas ( $\Phi_{ST}$ ) entre as populações variaram entre 0,012 e 0,175 (Tabela 7). A correlação cofenética do agrupamento por UPGMA dessa matriz de distâncias foi relativamente baixa ( $r = 0,8$ ), de modo que as ligações do dendrograma não refletem corretamente os padrões multivariados de distância genética (Figura 20). Essa correlação cofenética baixa é esperada para sistema que não apresentam uma estruturação hierárquica muito clara (Rodrigues & Diniz-Filho 1998). Nesses casos as análises de ordenação podem ser úteis no sentido de detectar padrões espaciais.



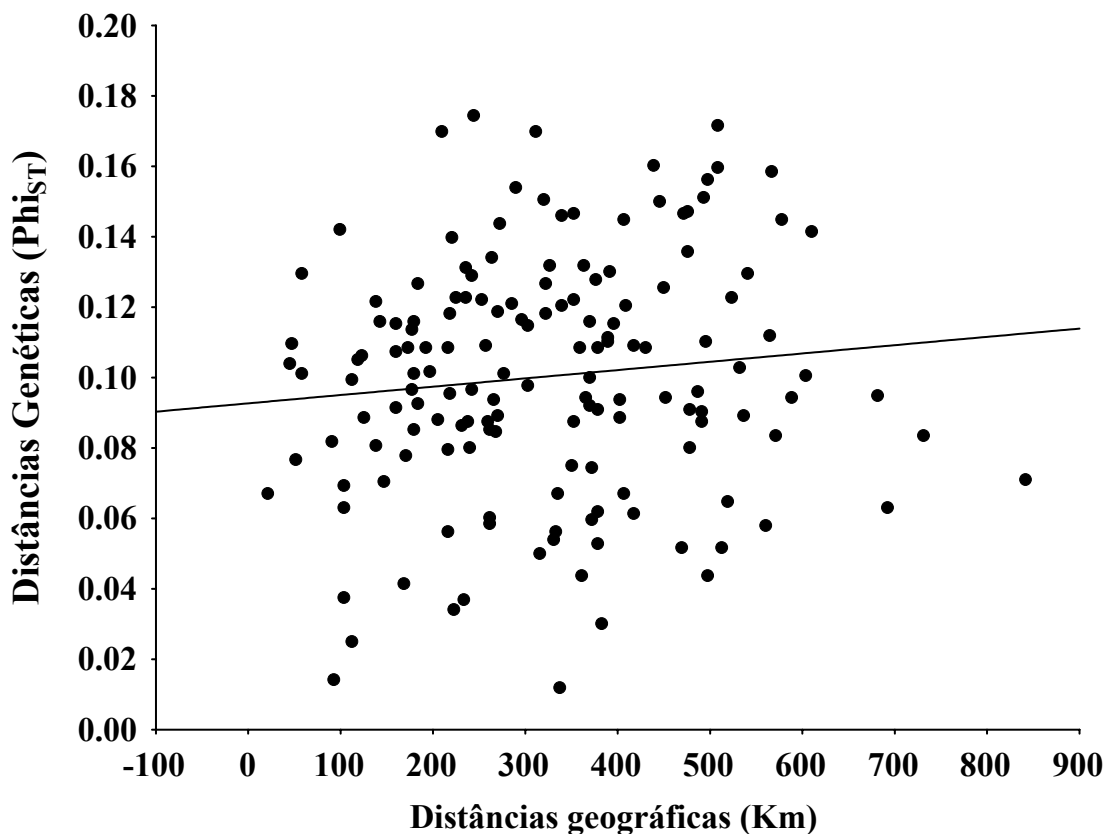
**Figura 20.** Padrão de divergência genética entre as 18 populações de *Physalaemus cuvieri*, definido pelo agrupamento por UPGMA, com base nas distâncias genéticas ( $\Phi_{ST}$ ). Correlação cofenética igual a 0,8.

O mesmo pode ser dito do escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS), cujo *stress* em três dimensões foi igual a 0,376, e a correlação entre as distâncias genéticas originais e as distâncias no espaço tridimensional foi igual 0,873 (Figura 21). Ou seja, não é satisfatório representar as distâncias genéticas nesse espaço tri-dimensional (Kruskal, 1964). Pode-se observar, pelo NMDS, que existem populações que estão em lados opostos tanto no espaço geográfico quanto genético (populações 8 e 18). Por outro lado, existem populações muito distantes no espaço geográfico que são muito próximas no espaço genético (populações 2 e 14). Alguns grupos de populações próximas no espaço geográfico são também similares do espaço genético (tais como a 2 e 3; 7 e 17; 4 e 6). Ou seja, não existe um único padrão espacial que possibilite a interpretação global da estruturação da variabilidade genética, sugerindo que investigações mais detalhadas e que levem em conta outras variáveis que possivelmente estejam interferindo na microevolução destas populações devem ser realizadas.



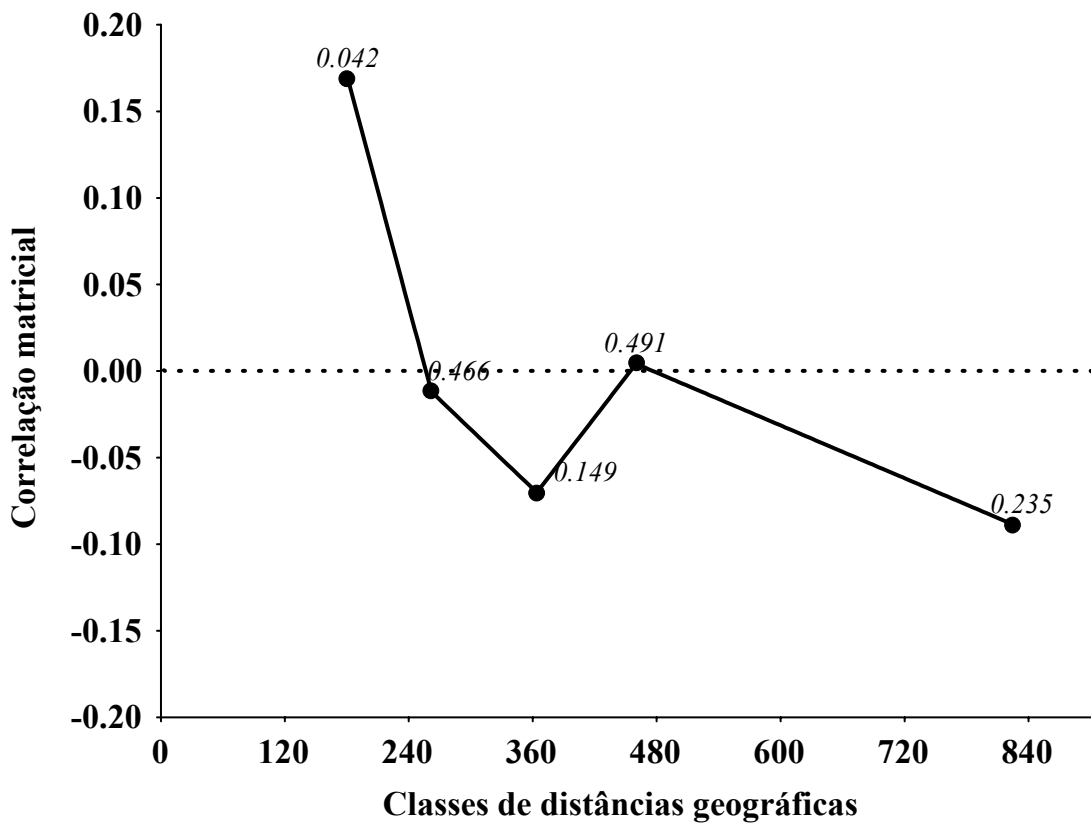
**Figura 21.** Análise tri-dimensional mostrando a posição relativa das 18 populações de *P. cuvieri* no espaço genético ( $\Phi_{ST}$ ) reduzido por uma análise de escalonamento multidimensional não métrico (NMDS).

Na escala geográfica analisada, tanto as técnicas de análises multivariadas exploratórias como o UPGMA e o escalonamento multidimensional não-métrico não foram muito eficientes no sentido de reconstruir estes padrões. Ainda no sentido de investigar o padrão espacial, o teste de mantel apresentou uma correlação matricial entre distância genética ( $\Phi_{ST}$ ) e geográfica igual a 0,140 ( $P = 0,129$ , com 5000 permutações) (Figura 22). Esses resultados mostram que, de fato, a distância geográfica sozinha não explica o padrão espacial da variabilidade genética entre essas populações de *P. cuvieri*.



**Figura 22.** Relação entre distância genética ( $\Phi_{ST}$ ) e distância geográfica ( $r = 0,140 - P = 0,129$ , com 5000 permutações) entre 18 populações de *P. cuvieri*.

O correlograma multivariado que permite relacionar o coeficiente de correlação matricial com o aumento das distâncias geográficas (Figura 23) mostrou que existe um padrão de isolamento-por-distância na variação genética, com populações próximas no espaço geográfico, situadas entre si a distâncias menores do que 180 quilômetros, tendendo a ser mais similares geneticamente entre si do que o esperado pelo acaso ( $r = 0,169$   $p = 0,042$  com 5000 permutações). À medida que as distâncias geográficas aumentam as correlações matriciais diminuem e deixam de ser significativas.



**Figura 23.** Correlograma de Mantel construído com base nas distâncias genéticas ( $\Phi_{ST}$ ) entre 18 populações de *P. cuvieri*, ao longo de cinco classes de distâncias geográficas. A linha tracejada mostra a correlação esperada sob a hipótese nula de ausência de padrão espacial. Os números indicam a probabilidade de erro tipo I obtida usando 5000 permutações pelo teste de Mantel, somente o coeficiente da primeira classe de distância foi significativo a um nível de 5%.

***Correspondência entre Distâncias Genéticas e Dados Sócio-Econômicos e Ambientais***

Os testes de Mantel utilizando as diferenças para as 38 variáveis de agricultura, sócio-econômica, de fragmentação e ambientais (Tabela 10) também mostram poucos padrões claros. Valores de  $r$  significativos a um nível de 5% foram obtidos apenas para a percentagem de matas, elevação e temperatura, embora o poder de explicação dessas variáveis também seja bastante pequeno ( $< 7\%$  em todos os casos). Além disso, é preciso considerar que nenhuma dessas correlações seria considerada significativa se critérios de correção para comparações múltiplas (Bonferroni) fossem utilizados. De qualquer modo, uma pequena parte da variação genética entre as populações seria explicada por potenciais barreiras climáticas (relacionadas à elevação e a temperatura) e a processos de fragmentação (percentagem de matas dentro da área municipal).

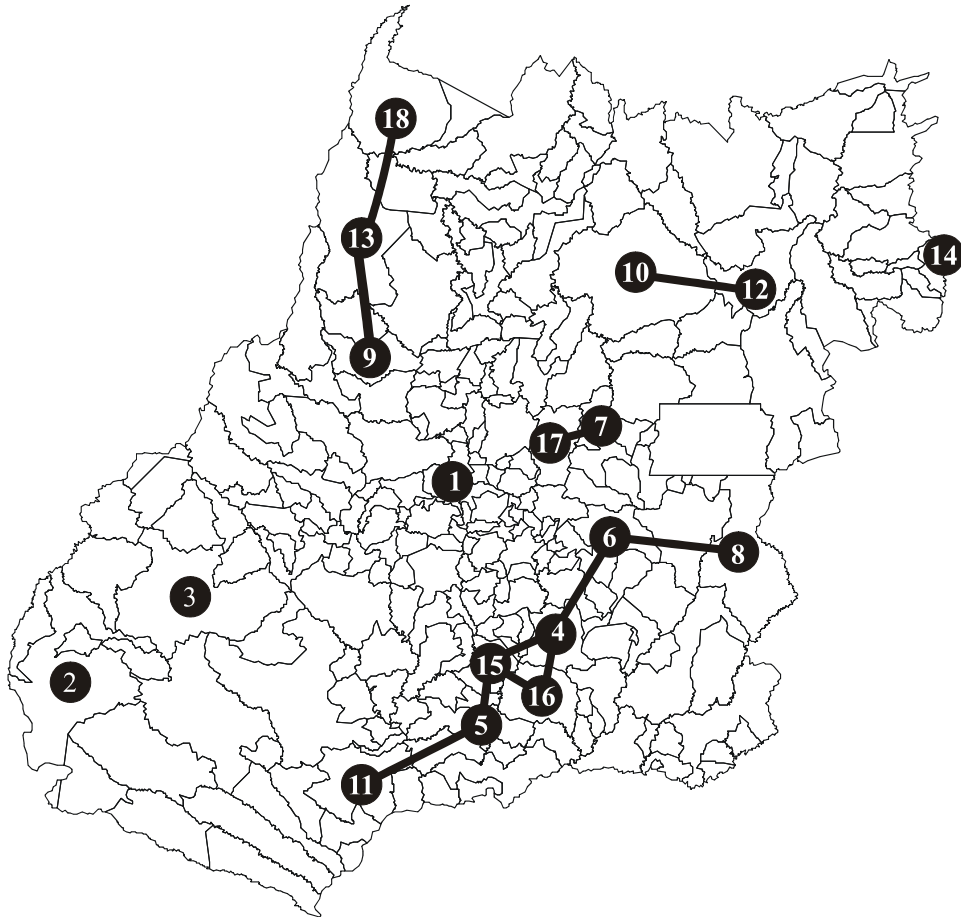
**Tabela 10.** Resultados do teste de Mantel (correlação matricial  $r$ ) comparando as distâncias genéticas à matrizes de diferença intermunicipais para variáveis de agricultura, ambientais, sócio-econômicas e demográficas, e de paisagem, ou a matrizes de distância euclidiana entre os municípios com base nesses conjuntos de variáveis. Os valores de P foram obtidos utilizando 5000 permutações.

<i>Variáveis / Matrizes</i>	$\Phi_{ST}$	
	$r$	$P$
ESTAB	-0,0991	0,2286
ADUBOS	0,0368	0,3900
ARROZ	-0,1267	0,1820
BOVINO	0,1438	0,1752
CURVA DE NÍVEL	0,2020	0,0864
PRAGAS	0,1823	0,0786
DESPESAS	0,0606	0,2842
ELETRICIDADE	0,0897	0,2526
IRRIGAÇÃO	0,0375	0,3576
LAVOURA	0,2301	0,0876
MATA	0,2714	<b>0,0476</b>
MILHO	0,1500	0,1490
MAQUINARIA	0,0164	0,4362
PASTAGEM	-0,0303	0,4202
POPRUR	-0,1011	0,2252
SOJA	0,1667	0,1566
PRODUÇÃO ANIMAL	0,1518	0,1484
PRODUÇÃO VEGETAL	0,1442	0,1716
<i>Variáveis de agricultura</i>	0,2353	0,0504

Tabela 10. Continuação...

<i>Variáveis / Matrizes</i>	$\Phi_{ST}$	
	<i>r</i>	<i>P</i>
EVAP	-0,1152	0,1272
PREC	0,0870	0,0656
ELEVAÇÃO	0,2088	<b>0,0208</b>
NPP	-0,1141	0,2100
PET	0,0986	0,2078
TMAX	0,1575	0,1030
TMED	0,2001	0,0564
TMIN	0,2675	<b>0,0320</b>
<i>Variáveis ambientais</i>	0,0806	0,2288
AF	0,0933	0,2428
NF	0,1143	0,1956
<i>Variáveis de fragmentação</i>	0,0005	0,4860
ANO	-0,0044	0,4880
DENS	0,0374	0,3580
IDHM-EDUCAÇÃO	-0,0118	0,4788
IDHM-LONG	0,0096	0,4426
IDH-RENDAS	-0,0418	0,3860
IDHM	-0,0997	0,2664
POP	0,0200	0,4160
POPURB	-0,0173	0,4416
RENDAS	-0,0393	0,4166
FECUND	-0,0687	0,3062
<i>Variáveis demográficas e sócio-econômicas</i>	-0,0315	0,4102
<i>Todas as variáveis</i>	0,1212	0,1602

A análise de descontinuidade (Figura 24) mostrou uma série de barreiras aparecendo na região mais ao Sudeste do Estado de Goiás, separando inclusive populações muito próximas no espaço geográfico, como é o caso das populações de Cocalzinho de Goiás (7) e Pirenópolis (17). Barreiras fora dessa região existem apenas entre as populações de Araguapaz (9), Nova Crixás (13) e São Miguel do Araguaia (18), e entre as populações de Niquelândia (10) e São João d'Aliança (12).

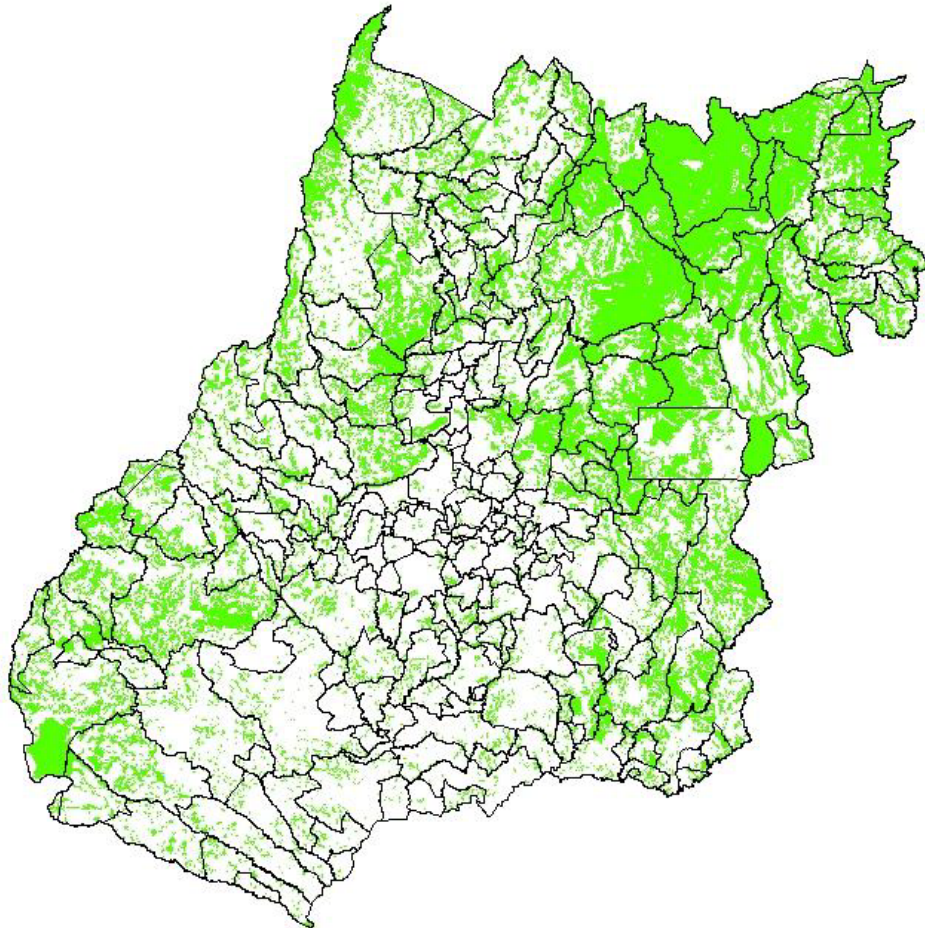


**Figura 24.** Resultado da análise de descontinuidade genética sobre a rede de Delaunay, com as linhas cheias indicando presença de barreiras.

Uma inspeção visual das distâncias genéticas nessas conexões em relação ao mapa de fragmentos naturais remanescentes no Estado de Goiás com área > 100 ha (Figura 25) sugere que efeitos antrópicos ligados à fragmentação da paisagem podem estar interferindo nos padrões de divergência genética. A fim de avaliar de modo quantitativo essa hipótese, pareou-se as distâncias genéticas ao longo das conexões de Delaunay com dados médios ou somas de algumas variáveis mais associadas a esse processo, que foram combinadas em 12 modelos (Tabela 11). O menor valor de Akaike ( $AIC_C$ ) corrigido para pequenas amostras foi obtido para o modelo que usa como preditores população humana e ano médio de instalação dos municípios (P + A, com  $AIC_C = 11,0909$ ), seguido pelo modelo com as duas variáveis de fragmentação (AF + NF, com  $AIC_C = 11,0932$ ) e pelo modelo envolvendo distâncias



geográficas e ano de instalação dos municípios (G + A, com  $AIC_C = 11.0933$ ). Os demais modelos apresentam valores de delta maiores do que 2 em relação ao modelo com menor  $AIC_C$ , sendo portanto pouco informativos. Os valores de  $w_i$  desses três modelos são relativamente pequenos, em torno de 28,8%, de modo que há uma considerável incerteza quanto à sua escolha. De qualquer modo, o valor do coeficiente de determinação do modelo (P + A) foi igual a 26,3%, sendo duas vezes maior do que o  $R^2$  dos dois outros modelos semelhantes para o  $AIC_C$  (iguais a 13%).



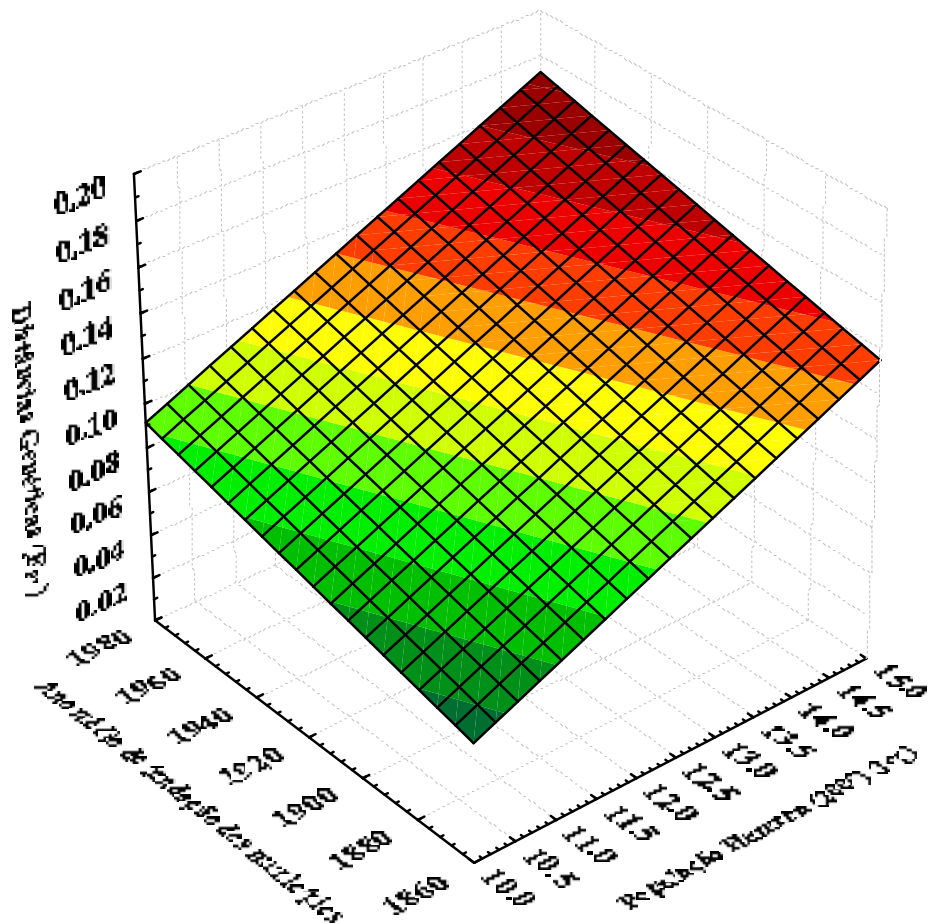
**Figura 25.** Mapa dos Remanescentes Florestais no Estado de Goiás (SEMARH, 2004).

**Tabela 11.** Resultados da seleção de modelos para explicar a divergência genética ao longo das conexões na rede de Delaunay, utilizando o critério de Akaike. Valores de  $\Delta_i$  menores do que 2 indicam modelos mais informativos.

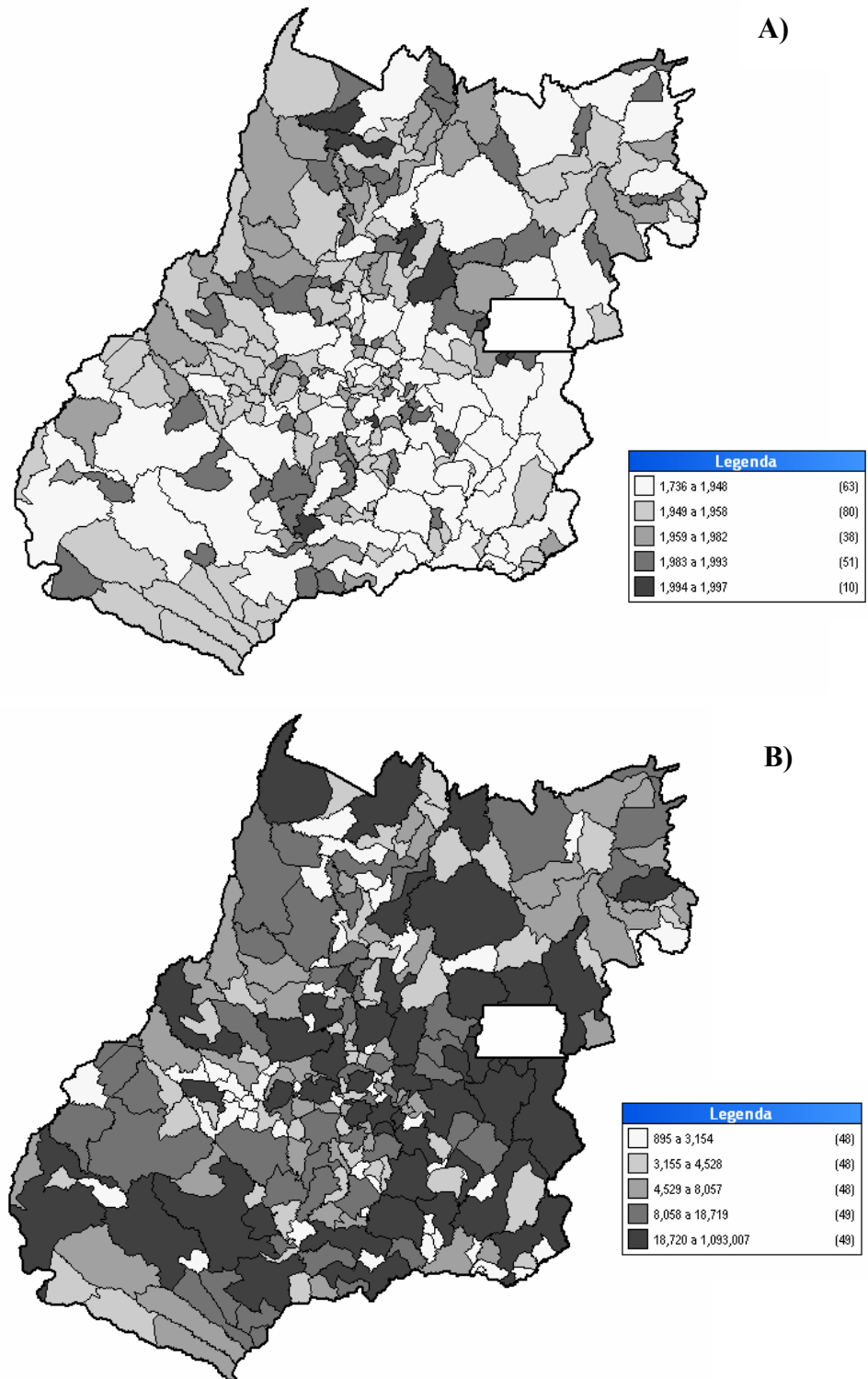
	Modelos*	$AIC_C$	$\Delta_i$	$w_i$	$R^2$
1	Saturado	40,51240	29,42150	0,00000	0,34560
2	G+A	11,09330	<b>0,00240</b>	0,28843	0,13570
3	G+A+P	15,01392	3,92302	0,04062	0,26540
4	G+A+P+R	19,64992	8,55902	0,00400	0,28480
5	G+A+P+R+Nm	25,21308	14,12218	0,00025	0,30970
6	NF+AF	11,09325	<b>0,00235</b>	0,28844	0,13850
7	NF+AF+P	15,01321	3,92231	0,04063	0,30280
8	NF+AF+P+Nm	19,64956	8,55866	0,00400	0,30380
9	NF+AF+P+Nm+R	25,21302	14,12212	0,00025	0,31320
10	A+G+NF+AF	19,65230	8,56140	0,00399	0,15930
11	P+R+Nm	15,01367	3,92277	0,04062	0,27870
12	P+A	11,09090	<b>0,00000</b>	0,28878	0,26260

\*Variáveis preditores nos modelos: Distâncias geográficas, em escala logarítmica (G); Ano médio de instalação dos municípios (A); População humana no ano 2000, em escala logarítmica (P); Renda per capita (R); Número de municípios ao longo da conexão de Delaunay (NM); Número de fragmentos naturais (NF); Área dos fragmentos naturais (AF).

Essa análise mostra, portanto, que o ano de instalação, o tamanho da população humana, a distância geográfica, o número e área dos fragmentos são as variáveis mais importantes para explicar as distâncias genéticas ao longo das conexões, nessa ordem, de acordo com os valores combinados de  $w_i$  dos modelos nas quais elas aparecem. No modelo mais explicativo (Figura 26), distâncias genéticas mais elevadas aparecem em conexões com maior população humana e com anos médios de instalação mais elevados (menos tempo até o presente). Observando os mapas (Figura 27), pode-se perceber que a combinação dos efeitos dessas duas variáveis preditoras (P e A) explica diferentes conjuntos de barreiras, o que é esperado considerando a baixa correlação entre P e A ao longo da rede ( $r = -0,019$ ).



**Figura 26.** Relação entre Distância Genética, Ano médio de fundação dos Municípios e População Humana (2000), ao longo das conexões da rede de Delaunay.



**Figura 27.** (A) Mapa do ano de instalação dos municípios do Estado de Goiás e (B) Mapa da densidade demográfica nos municípios do Estado de Goiás em 2000 (PNUD, 2003).

## DISCUSSÃO

### *Estrutura populacional em *Physalaemus cuvieri**

A análise de repetibilidade dos locos (bandas) gerados pelo RAPD mostrou que, conforme encontrado por outros autores (McPherson et al. 1993; Perez et al 1998; Kjolner et al. 2004), este marcador é confiável, podendo ser utilizado em estudos de genética de populações (ver Sunnucks 2000). Para tanto, deve-se padronizar as condições das reações de PCR e, se possível, utilizar um único termociclador durante a obtenção dos dados moleculares, minimizando as possibilidades de amplificação inespecíficas.

A análise das populações para a variação nos 126 locos RAPD indicou que há uma estruturação da variabilidade genética para a rã-cahorro (*Physalaemus cuvieri*) em Goiás, como observado para muitas espécies de anfíbios e outros organismos na mesma região (Driscoll 1998; Marsh & Trenham 2001; Batista 2001; Telles et al. 2003; Palo et al. 2004b). Entretanto, apesar de haver diferenças significativas entre as populações, o padrão espacial é fraco e o fluxo gênico está restrito a populações próximas geograficamente. Assim, é possível assumir, a princípio, que as populações desta espécie estão evoluindo atualmente sob um modelo de “alpondras”. Considerando que o número médio de migrantes por geração, obtido a partir dos estimadores de  $F_{ST}$  (Gillespie 1998; Rousset 2004), foi igual a 2, pode-se entender que este número de migrantes seria suficiente para suprimir a maior parte dos efeitos da deriva genética atuando na diferenciação entre as populações (Barber 1999; Beebe & Rowe 2004).

Batista (2001) realizou um trabalho com *Physalaemus cuvieri*, também utilizando RAPD, com amostras provenientes de seis populações oriundas de duas regiões bem distintas do Brasil (Vilhena - RO e Brasília - DF) e detectou um nível de estruturação semelhante ao encontrado neste estudo ( $F_{ST} = 0,15$  e  $\theta = 0,11$ ), mesmo considerando a maior escala espacial analisada. Isso reforça a idéia de um padrão espacial próximo ao modelo de “alpondras”, no

qual a dissimilaridade genética seria dependente da distância geográfica, apenas até um dado limite. Batista (2001) sugeriu que a fragmentação dos habitats no Cerrado não estaria causando a diferenciação entre as populações, nas diferentes escalas espaciais analisadas. Uma das explicações plausíveis para isso seria o tamanho das populações, considerando que esta espécie normalmente ocorre em altas densidades populacionais, e que este fato poderia estar tamponando o efeito da deriva e mantendo as populações mais homogêneas.

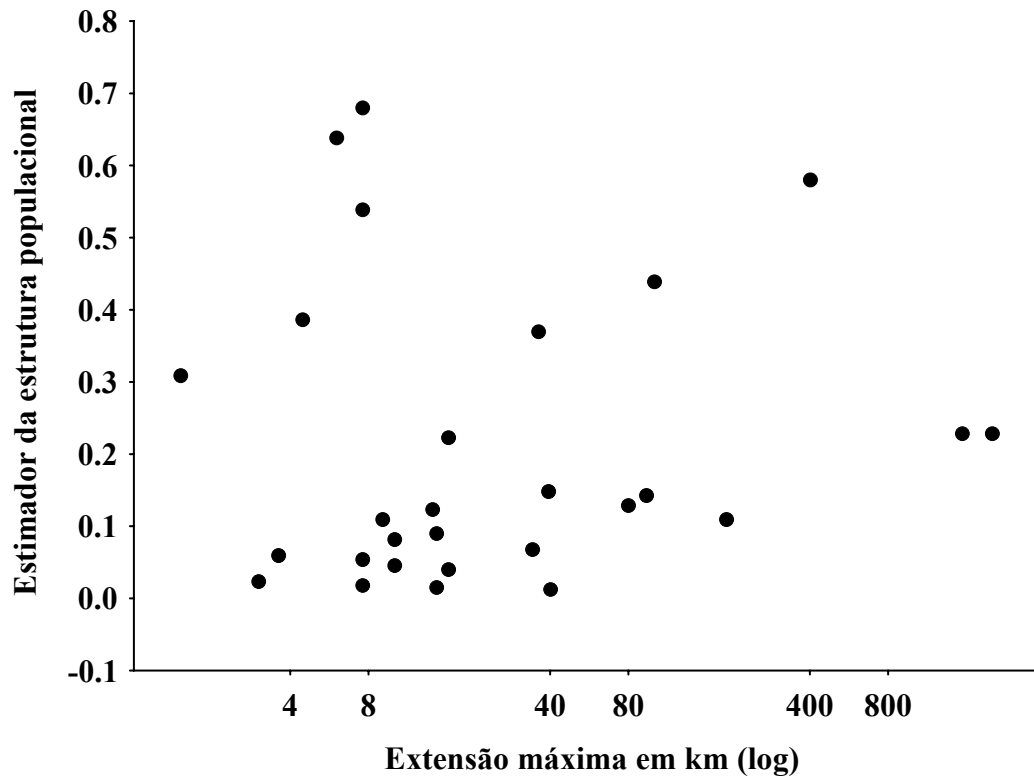
Em muitos estudos sobre variação genética intraespecífica em anfíbios, conduzidos em escalas geográficas muito variadas, uma elevada estruturação da variabilidade genética foi encontrada na maior parte dos casos. Apesar de ser evidenciada uma estruturação significativa da variabilidade genética existente nas populações de *Physalaemus cuvieiri*, quando os valores das estatísticas-F são comparados com outros estudos realizados com diferentes marcadores em diferentes espécies de anfíbios percebe-se que esse nível de diferenciação deve ser considerado, de fato, relativamente baixo (Phillips 1994; Rowe et al. 1998; Barber 1999).

É importante ressaltar que a maioria dos estudos é conduzida utilizando marcadores de regiões mitocondriais, que são mais dependentes da história de fundação de cada população devido ao modo de herança do DNA nessa organela. Nesse sentido, as comparações devem ser feitas com cautela, pois a evolução do genoma nuclear normalmente ocorre de maneira diferenciada dos genomas das organelas citoplasmáticas. Por outro lado, também existem alguns estudos que trabalharam em escalas espaciais bem menores do que a utilizada neste trabalho e que obtiveram valores de  $F_{ST}$  muito altos (Routman 1993; Hitchings & Beebee 1997; Driscoll 1998; Eastel 1998; Rowe et al. 1998; Murphy et al. 2000; Rowe et al. 2000; Shaffer et al. 2000; Carnaval 2002; Lampert et al. 2003), indicando que fatores ecológicos e comportamentais podem criar estruturas populacionais em escalas bastante locais (Palo et al. 2004a; Beebee & Rowe 2004). Há, portanto, uma grande variação nos valores de  $F_{ST}$  que parece ser independente da escala espacial analisada (Tabela 12 e Figura 28), revelando a

grande complexidade de fatores ecológicos, evolutivos e comportamentais atuando no sentido de gerar estruturas espaciais nas diferentes espécies.

**Tabela 12.** Relação das referências dos 28 estudos de diferenciação populacional em anfíbios utilizando diferentes marcadores moleculares, extensão espacial máxima (km) do estudo e valores dos estimadores da estrutura populacional (estimados pelo  $F_{ST}$  ou estatísticas relacionadas).

artigo	marcador	escala (km)	Estatística-F	Referência
1	microsatélites	1535	0,230	Palo et al., 2004a
2	isoenzimas	100	0,440	Shaffer et al., 2000
3	microsatélites	400	0,580	Shaffer et al., 2000
4	microsatélites	40	0,014	Newman & Squire, 2001
5	isoenzimas	3	0,026	Newman & Squire, 2001
6	isoenzimas	14	0,124	Newman & Squire, 2001
7	isoenzimas	39	0,149	Newman & Squire, 2001
8	isoenzimas	36	0,372	Newman & Squire, 2001
9	isoenzimas	1,5	0,310	Newman & Squire, 2001
10	isoenzimas	14,5	0,090	Newman & Squire, 2001
11	microsatélites	14,5	0,016	Newman & Squire, 2001
12	isoenzimas	7,5	0,019	Newman & Squire, 2001
13	microsatélites	3,6	0,060	Newman & Squire, 2001
14	microsatélites	16	0,224	Newman & Squire, 2001
15	microsatélites	9	0,111	Newman & Squire, 2001
16	isoenzimas	80	0,131	Newman & Squire, 2001
17	isoenzimas	7,5	0,540	Newman & Squire, 2001
18	isoenzimas	7,5	0,680	Newman & Squire, 2001
19	microsatélites	34	0,070	Newman & Squire, 2001
20	microsatélites	16	0,040	Newman & Squire, 2001
21	isoenzimas	4,4	0,388	Newman & Squire, 2001
22	isoenzimas	93	0,145	Newman & Squire, 2001
23	isoenzimas	7,5	0,054	Newman & Squire, 2001
24	isoenzimas	6	0,639	Murphy et al., 2000
25	microsatélites	10	0,045	Jehle et al., 2001
26	microsatélites	10	0,082	Jehle et al., 2001
27	microsatélites	191	0,110	Austin et al., 2003
28	microsatélites	2000	0,230	Palo et al., 2003



**Figura 28.** Ausência de relação entre estimadores da estrutura populacional (estimados pelo  $F_{ST}$  ou estatísticas relacionadas) e a extensão espacial máxima (km), para 28 estudos de diferenciação populacional em anfíbios utilizando marcadores moleculares ( $r = 0,065$ ;  $P = 0,745$ ).

Lampert et al. (2003), trabalhando com *Physalaemus pustulosus*, mostraram que existe uma forte correlação positiva entre as distâncias genéticas e geográficas, considerando populações que estão distantes entre si em média por 260 metros, ou seja, uma escala bem pequena de distância espacial. Mesmo em uma escala maior, no presente estudo o mesmo não foi encontrado para *Physalaemus cuvieri*.

Assim, considerando os padrões espaciais relativamente fracos e a baixa heterogeneidade espacial entre as populações, torna-se difícil encontrar explicações gerais para a estruturação da variabilidade genética (Sokal et al. 1986). Os resultados obtidos pela análise de RAPD nas populações em Goiás são coerentes com os aspectos da biologia de *Physalaemus cuvieri*, ou seja, a espécie é amplamente distribuída na região do Cerrado,



ocorre em densidades populacionais locais elevadas (que limitam o efeito de processos estocásticos de diferenciação) e possui uma dispersão provavelmente baixa e em pequenas escalas espaciais, levando a valores relativamente baixos de  $F_{ST}$ , mesmo quando são comparadas populações muito distantes no espaço geográfico (Batista 2001).

A análise de descontinuidades genéticas, no entanto, parece revelar que nas populações de *Physalemus cuvieri*, os valores obtidos para a sua subdivisão já podem ser considerados relevantes, pois mostra que algumas destas divergências podem ser explicadas por fatores antrópicos atuando em grandes escala geográficas, ao contrário do que foi encontrado por Batista (2001) para escalas locais. Conforme ressaltaram Colli et al. (2002), espécies abundantes e bem distribuídas, como *Physalaemus cuvieri*, podem ser de fato úteis no sentido de revelar processos gerais de perda de diversidade devido à ação humana e outros processos ecológicos.

O tempo com que as populações de uma espécie levam para manifestar os efeitos da fragmentação é variável (Fahrig 2003), tornando importante o conhecimento destes efeitos ao longo do tempo para explicar a estrutura genética. Isso também permite direcionar da maneira correta as estratégias de conservação e reintrodução de indivíduos nas populações, assegurando a manutenção da diversidade para garantir a sobrevivência das gerações futuras. Ao contrário do que foi encontrado por Batista (2001), as análises de descontinuidade genética deste estudo mostraram que parece existir um efeito da fragmentação na diferenciação das populações. Há uma coincidência entre a presença de barreiras e o padrão atual de fragmentação da paisagem natural no Estado de Goiás (ver Figuras 24 e 25). O processo de seleção de modelos mais explicativos para as barreiras genéticas confirma esta coincidência, já que as variáveis preditoras mais importantes foram o ano de instalação dos municípios e a população humana atual, ao longo das conexões de Delaunay. As barreiras situadas nas regiões central e sudeste do Estado de Goiás parecem estar mais associadas a elevadas densidades populacionais humanas, enquanto que as barreiras encontradas na região

noroeste do Estado de Goiás, estariam mais associadas com um processo de ocupação humana mais recente na região. Essa explicação é reforçada já que estes dois processos de ocupação humana devem, de fato, causar mudanças na paisagem, gerando fragmentação de habitats, estando estruturadas geograficamente no Estado de Goiás. Assim, pelo menos nestas grandes escalas espaciais, o processo de seleção de modelos tende a priorizar características gerais de ocupação humana no Estado de Goiás que estariam afetando indiretamente as divergências genéticas entre as populações de *P. cuvieri* por meio de aceleração na perda de habitat natural. É importante ressaltar que o poder de explicação dos modelos de um modo geral foi relativamente baixo (< 30%), de modo que existe uma grande quantidade de variação que não pôde ser explicada para as divergências entre as populações.

Deste modo, esses fatos sugerem que o padrão atual da variabilidade genética presente nas populações de *Physalaemus cuvieri* deve ter sido gerado sob um efeito de fragmentação recente de habitats. Portanto, deve-se delinear estratégias de conservação que priorizem as áreas que de fato podem ser preservadas, conservando, desta forma, a variabilidade genética existente nesta espécie.

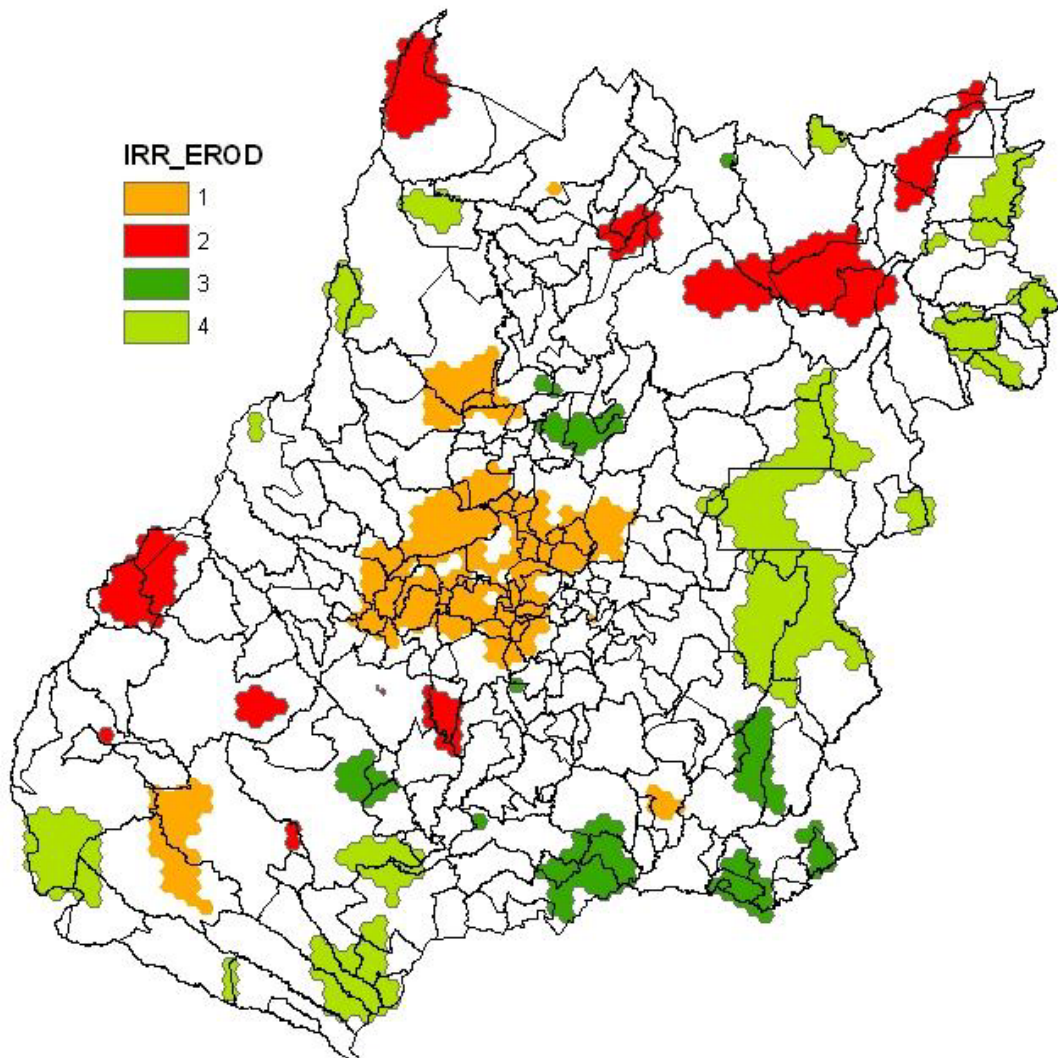
### ***Estratégias para a conservação da variabilidade genética***

Os resultados deste estudo mostram importantes efeitos de uma dinâmica diferenciada de ocupação humana entre as regiões do Estado de Goiás, que por sua vez determinam conseqüências diversas para a paisagem natural. Por exemplo, a inquestionável ameaça sobre a biodiversidade do Cerrado, em algumas regiões, vem da expansão das atividades agropecuárias, já que os estabelecimentos rurais ocupam quase toda a extensão do território estadual. A legislação ambiental, que desde 1965 determina que 20% da área dos imóveis rurais sejam destinados à preservação permanente, tem se mostrado – pela dificuldade de fiscalização – um instrumento ineficaz para, por si só, garantir a preservação ambiental. Assim, na maioria das propriedades das regiões sudoeste e sul do Estado, o remanescente de

vegetação original é inferior a 10% e as formações florestais já foram quase que inteiramente suprimidas (Galinkin 2003). De fato, o mapa de remanescentes de vegetação natural (Figura 22) mostra que nesta região restam áreas pequenas e muito fragmentadas de ambientes naturais. Assim, apesar do processo de ocupação humana ser relativamente recente, em termos de tempo ecológico-evolutivo, os resultados das análises genéticas já permitiram verificar que essa região, de fato, será um problema para a definição de estratégias de conservação para esta espécie e para biodiversidade como um todo (ver Lande 1999). No caso de *P. cuvieri*, especificamente, populações viáveis podem ocupar áreas relativamente pequenas, de modo que mesmo essas regiões nas quais praticamente não existem fragmentos representativos na vegetação nativa, podem conter habitats adequados para esta espécie. Sendo assim, o problema a ser resolvido seria encontrar uma forma de possibilitar a conectividade entre estas pequenas “ilhas” para permitir o fluxo gênico e conseqüentemente a viabilidade das populações desta espécie a médio e longo prazo.

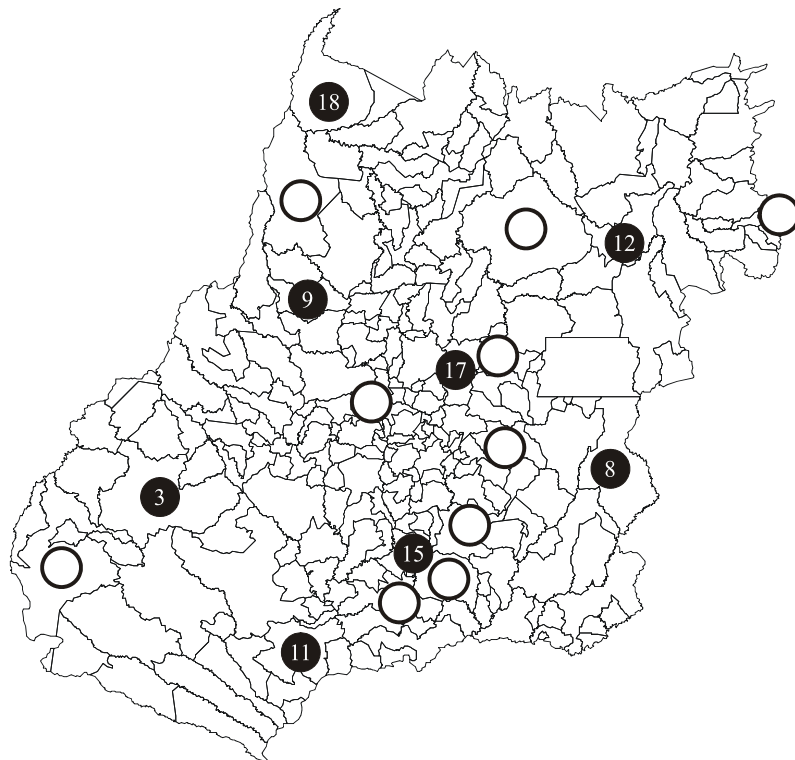
Neste contexto uma questão importante a se considerar é que essas regiões do sudoeste e sul do Estado de Goiás, que seria importante para a preservação da variabilidade genética de *P. cuvieri* e que refletem mais claramente os efeitos da fragmentação sobre a biodiversidade, estão pouco representadas no mapa de áreas prioritárias para a conservação da biodiversidade em Goiás (Figura 29) (SEMARH 2004). Este mapa foi elaborado com base em procedimentos de otimização que maximizam atingir as metas previamente definidas, minimizando impactos dessa conservação sobre as atividades de desenvolvimento sócio-econômico (ver Cabeza & Moilanen 2001). Os alvos de conservação considerados foram espécies de vertebrados terrestres ameaçadas de extinção e endêmicas do Brasil, além de 85 diferentes tipos de formações fito-fisionômicas. Assim, devido ao baixo número de remanescentes florestais e o alto “custo” para a conservação na região sudoeste e sul do Estado de Goiás, o procedimento de otimização excluiu a maior parte dessa região ao alcançar as metas estabelecidas alocando áreas em região de menor custo. Essas análises, por diversas razões, são realizadas

normalmente em níveis hierárquicos acima do nível de espécie. A baixa representatividade da variabilidade genética intra-específica para uma dada espécie focal (no caso, *P. cuvieri*), reflete a quase total impossibilidade de representar de modo coerente o total da biodiversidade em um sistema de conservação nos seus diferentes níveis hierárquicos (ver Pressey 2004; Brooks et al. 2004). Portanto, é interessante discutir procedimentos para a definição de estratégias que preservem o máximo possível da estrutura genética populacional de uma espécie.



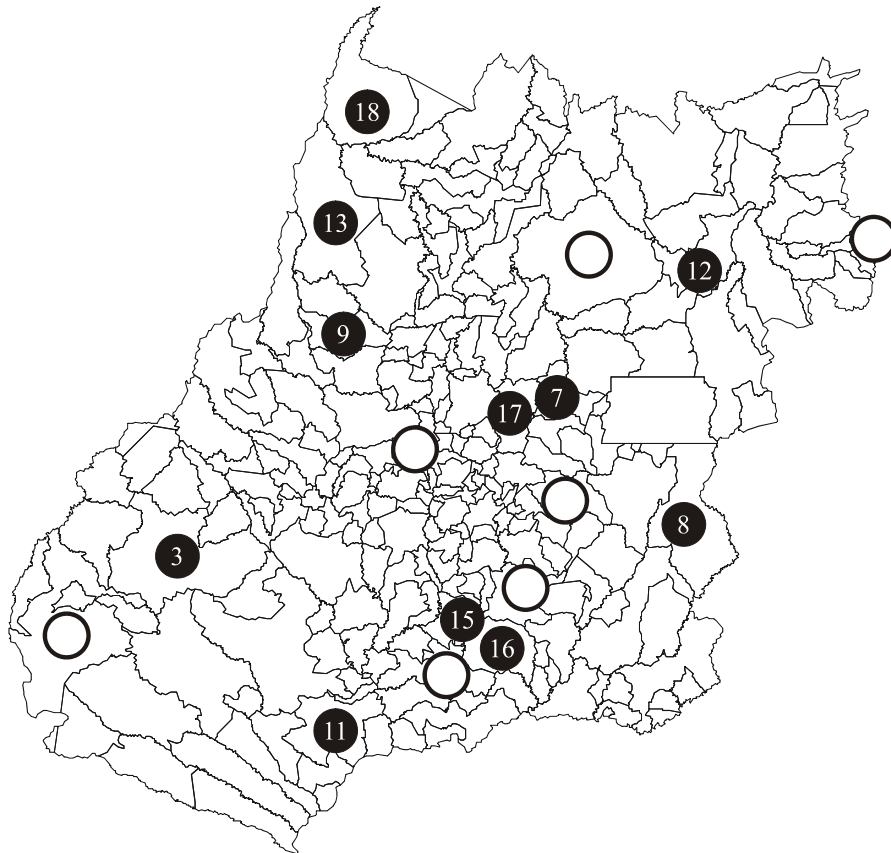
**Figura 29.** Áreas prioritárias para a conservação da biodiversidade em Goiás, em níveis variando de 1 (menor prioridade) a 4 (maior prioridade) .

Seguindo a metodologia proposta por Diniz-Filho & Telles (2002), as populações de *P. cuvieri* (amostras) distantes entre si a cerca de 180 km (o intercepto do correlograma, ver Figura 23) poderiam ser consideradas como Unidades Operacionais, ou seja, unidades genéticas independentes para a conservação da variabilidade genética desta espécie. Embora existam muitas outras populações de *P. cuvieri* que não foram amostradas neste trabalho, utilizou-se a configuração espacial das 18 populações analisadas geneticamente a fim de propor um conjunto mínimo de populações que permitiriam a manutenção da maior parte da diversidade genética quantificada via marcadores RAPD. A rede de Unidades Operacionais (UO) pode ser desencadeada a partir da localidade com maior variabilidade genética intrapopulacional. Para *P. cuvieri* a população de Pontalina (15) apresentou maior índice de diversidade genética e maior número de locos polimórficos (Tabela 5), e pelo menos um indivíduo que contém bandas nos 126 locos analisados. A partir da população de Pontalina (15) forma selecionadas apenas populações que distem entre si aproximadamente 180 km, totalizando assim um total de 8 Unidades Operacionais para o Estado de Goiás (Figura 30).



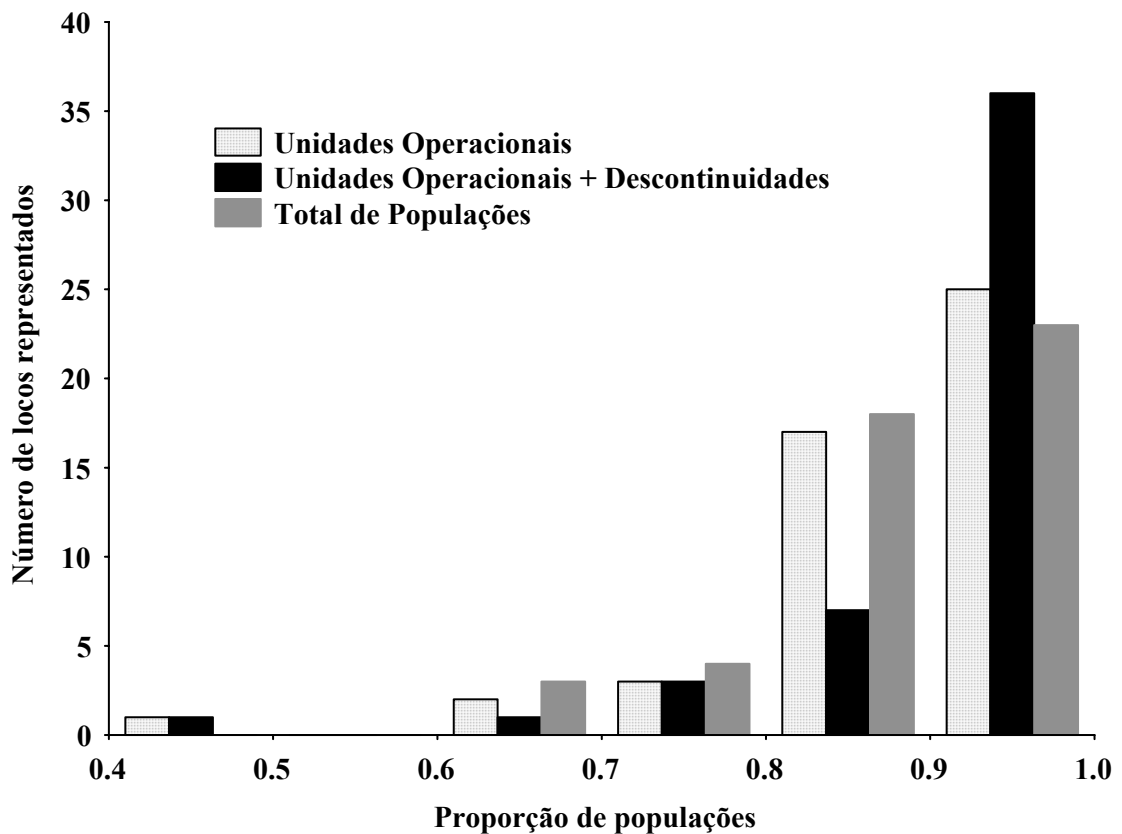
**Figura 30.** Uma possibilidade para a definição de Unidades Operacionais Intraespecíficas definidas com base no correlograma multivariado.

Entretanto, mesmo populações próximas geograficamente podem apresentar descontinuidades genéticas em função dos processos de ocupação humana, principalmente nas regiões sudoeste e sul do Estado, conforme já discutido. Essa descontinuidade causa inclusive uma subestimativa da magnitude da redundância na variabilidade genética medida pelo teste de Mantel. Assim, o procedimento de escolha de Unidades Operacionais precisa ser modificado a fim de corrigir essas descontinuidades espaciais, tal qual realizado por Diniz-Filho & Telles (2002) para populações de ursos do Alasca. Para levar em consideração esse efeito de descontinuidades genéticas, a rede de Unidades Operacionais mostrada na Figura 30 foi modificada, adicionando-se como novas unidades que apresentassem descontinuidade a uma Unidade Operacional previamente definida, desde que essa nova Unidade não fosse redundante em relação à outra Unidade. Por este procedimento foram adicionadas mais três Unidades Operacionais (Figura 31).



**Figura 31.** Uma possibilidade para a definição de Unidades Operacionais Intraespecíficas definidas com base no correlograma multivariado, levando-se em conta a presença de descontinuidade.

Como do total dos 126 locos RAPD analisados, 78 estão representados em pelo menos um indivíduo das 18 populações, a análise de representatividade dos dois conjuntos de Unidades Operacionais definidas anteriormente (Figura 30 e 31) foi feita utilizando-se os 48 locos restantes. A representação das bandas destes locos nos conjuntos de Unidades Operacionais mostra que quando se leva em consideração a existência de descontinuidades, a maior parte dos locos está contida em uma maior proporção de Unidades Operacionais na rede (Figura 32). Deste modo essa seria a solução mais eficiente na definição de Unidades Operacionais para a conservação da variabilidade genética existente.



**Figura 32.** Distribuição do número de locos representados com diferentes proporções no conjunto de populações locais utilizadas como unidades operacionais para a conservação.

Nota-se, entretanto, que existe pouca correspondência entre essa rede otimizada das 11 Unidades Operacionais e o mapa de áreas prioritárias para a conservação da biodiversidade em Goiás. Deste modo, outras estratégias devem ser definidas e direcionadas especificamente para garantir a persistência dessas Unidades Operacionais para *P. cuvieri*. Outro ponto importante que deve ser considerado no contexto da metodologia proposta por Diniz-Filho & Telles (2002) é que, por definição, as Unidades Operacionais tornam-se mais isoladas geograficamente entre si, a fim de reduzir a redundância na variabilidade genética. Assim, é preciso garantir também que cada uma das Unidades Operacionais independentemente seja capaz de manter populações mínimas viáveis com pouca perda de diversidade genética por efeitos de deriva ou endogamia. No caso de *P. cuvieri* esses efeitos devem ser pequenos, já que suas populações locais normalmente ocorrem com grande abundância. De qualquer modo é preciso chamar a atenção para o elevado nível de fragmentação das regiões sudoeste e sul do Estado de Goiás, nas quais estariam concentradas algumas Unidades. Nesses casos, a persistência da variabilidade genética nas populações provavelmente poderia ser mantida, pelo menos em curto prazo, por uma estrutura metapopulacional (Smith & Green 2005; mas ver Higgins & Lynch 2001), de modo que a Unidade Operacional seria composta por um conjunto de populações locais vivendo em pequenos fragmentos que devem estar conectados de modo eficiente para permitir a ocorrência de fluxo gênico.



## CONCLUSÕES

- Os 126 locos RAPD analisados mostraram que existe uma estruturação da variabilidade genética entre as 18 populações de rã-cachorro (*Physalaemus cuvieri*) do Estado de Goiás, apresentando valores em torno de 0,10, para as três metodologias utilizadas para estimar o componente interpopulacional da variabilidade genética;
- Apesar de haver diferenças entre as populações para os locos, não há um padrão espacial da variabilidade genética claro, de acordo com as análises multivariadas (UPGMA e NMDS) e com o teste de Mantel correlacionando os valores de  $\Phi_{ST}$  às distâncias geográficas ( $r = 0,140$ ;  $P = 0,129$ , com 5000 permutações). O correlograma multivariado, entretanto, mostrou uma correlação significativa na primeira classe de distância geográfica (até 180 km), indicando que o fluxo gênico deve estar restrito a populações próximas geograficamente. Deste modo, é possível assumir, a princípio, que as populações desta espécie estão evoluindo atualmente sob um modelo de “alpondras”;
- De um modo geral, as correlações entre a matriz de distância genética e as diferenças nas 38 variáveis ambientais e sócio-econômicas não foram, de um modo geral, significativas pelos testes de Mantel, mostrando que a divergência genética entre as populações não pôde ser explicada simplesmente por diferenças nos valores dessas variáveis. A análise de descontinuidade genética (abaixo) mostrou que os próprios valores, em termos absolutos podem, por outro lado, explicar algumas das divergências genéticas;
- A análise de descontinuidade genética mostrou que as barreiras entre as populações locais parecem estar associadas a efeitos de fragmentação de habitat em grandes escalas espaciais. As variáveis que melhor explicaram estas descontinuidades foram o ano de instalação dos municípios e a população humana atual. Assim, o processo de

seleção de modelos explicativos (critério de Akaike) tendeu a priorizar características gerais de ocupação humana no Estado de Goiás, que estariam afetando indiretamente as divergências genéticas entre as populações de *P. cuvieiri* por meio da aceleração na fragmentação do habitat natural;

- A partir do correlograma multivariado e considerando a existência das discontinuidades genéticas foi possível estabelecer um total de 11 Unidades Operacionais para a conservação da variabilidade genética presente nas populações de *P. cuvieiri*. Embora essa estratégia maximize a representatividade do padrão de variabilidade genética interpopulacional, principalmente na região mais fragmentada do Estado (sudeste e sul), é preciso garantir que cada uma delas, independentemente, seja capaz de manter populações mínimas viáveis com pouca perda de diversidade genética por efeitos de deriva ou endogamia.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Ajara C., 1989. População. Pp 123-148, in Duarte A.C. (editor). Geografia do Brasil – Região Centro-Oeste. Fundação IBGE, Rio de Janeiro.
- Alfenas A.C., A. Dusi, F.M. Zerbini-Jr., I.P. Robinson, J.A. Micales, J.R. Oliveira, L.A.S. Dias, M. Scortichini, M.R. Bonde, S.K. Alonso, T.G. Junghans & W. Brune, 1998. Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins – fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG.
- Alfenas A.C., I. Peters, W. Brune & G.C. Passador, 1991. Eletroforese de Proteínas e isoenzimas de Fungos e Essências Florestais. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG.
- Allem A.C. & J.F.M. Valls, 1987. Recursos forrageiros nativos do Pantanal Mato-Grossense. Brasília, EMBRAPA-CENARGEN (Documentos, 8).
- Arnold M.L., C.M. Buckner & J.J. Robinson, 1991. Pollen-mediated introgression and hybrid speciation in Louisiana irises. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 88: 1398-1402.
- Arslan A., I. Ilhak, M. Calicioglu & M. Karahan, 2005. Identification of meats using random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique. Journal of Muscle Foods 16 (1): 37-45.
- Atlas of the Biosphere, 2002. Center for Sustainability and the Global Environment (SAGE), University of Wisconsin, Madison (Disponível em: <http://www.sage.wisc.edu/atlas/>)
- Austin J.D., J.A. Dávila, S.C. Loughheed & P.T. Boag, 2003. Genetic evidence for female-biased dispersal in the bullfrog, *Rana catesbeiana* (Ranidae). Molecular Ecology 12: 3165–3172
- Awise J.C & J.L. Hamrick, 1996. Conservation Genetics: case histories from nature. Chapman & Hall, New York-NY.
- Awise J.C., 2000. Phylogeography. Harvard University press, Cambridge, Massachusetts.

- Barbanera F., J.J. Negro, G. Di Giuseppe, F. Bertoncini, F. Cappelli & F. Dini, 2005. Analysis of the genetic structure of red-legged partridge (*Alectoris rufa*, Galliformes) populations by means of mitochondrial DNA and RAPD markers: a study from central Italy. *Biological Conservation* 122 (2): 275-287.
- Barber P.H., 1999. Patterns of gene flow and population genetic structure in the canyon treefrog, *Hyla arenicolor*. *Molecular Ecology* 8: 563-576.
- Barreto L. & G.V. Andrade, 1995. Aspects of the reproductive biology of *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leptodactylidae) in northeastern Brazil. *Amphibia-Reptilia* 16: 67–76.
- Bastos R.P., J.A.O. Motta, L.P. Lima & L.D. Guimarães, 2003. Anfíbios da Floresta Nacional de Silvânia, Estado de Goiás. R.P. BASTOS:Goiânia.
- Batista C.G., 2001. Estrutura genética populacional de *Physalaemus cuvieri* Fitzinger, 1826 (Lissamphibia: Leptodactylidae) em fragmentos antrópicos e naturais de Cerrado. Unpublished Master Thesis (Animal Biology), Universidade de Brasília, Brasília-DF.
- Beebee T. & G. Rowe, 2004. *An Introduction to Molecular Ecology*. Oxford University Press, Oxford.
- Bokermann W.C.A., 1962a. Observações biológicas sobre *Physalaemus cuvieri* (Fitz.), 1826 (Amphibia, Salientia). *Revista Brasileira de Biologia* 22: 391–399.
- Bokermann W. C. A., 1962b. Sobre uma pequena coleção de anfíbios do Brasil Central, com a descrição de uma nova espécie de *Physalaemus* (Amphibia, Salientia). *Revista Brasileira de Biologia* 22: 213-219.
- Borges B.G., 2000. A economia goiana na divisão regional do trabalho (193-1960). Pp 247-272, in Silva L.S.D. *Relações cidade-campo: Fronteiras*. Editora da UFG, Goiânia.
- Bos D.H. & J.W. Sites-Jr. 2001. Phylogeography and conservation genetics of the Columbia spotted frog (*Rana luteiventris*; Amphibia, Ranidae). *Molecular Ecology* 10: 1499-1513.
- Brooks T., G.A.B. Fonseca & A.S.L. Rodrigues, 2004. Species, data, and conservation planning. *Conservation Biology* 18: 1682-1688.

- Browne M. & G. Mels, 2000. SYSTAT 10 – Statistics II. SPSS Inc., Chicago.
- Burham K.P. & D.R. Anderson, 2002. Model Selection and Multimodel Inference: A Practical Information-Theoretic Approach. 2<sup>o</sup>ed. Springer, New York.
- Cabeza M & A. Moilanen, 2001. Design of reserve network and the persistence of biodiversity. *Trends in Ecology and Evolution*. 16: 242-248.
- Cardoso A.J., 1981. Biologia e sobrevivência de *Physalaemus cuvieri* (Fitz.) 1826 (Amphibia, Anura) na natureza. *Ciência e Cultura* 33: 1224–1228.
- Carnaval A.C.O.Q., 2002. Phylogeography of four frog species in forest fragments of Northeastern Brazil - a preliminary study. *Integrative and Comparative Biology* 42: 913-921.
- Carvalho, A.L. & J.A. Podestá-Filho, 1989. Solos. Pp 91-105, in Duarte A.C. (editor). *Geografia do Brasil – Região Centro-Oeste*. Fundação IBGE, Rio de Janeiro.
- Cavalcanti R.B. & C.A. Joly, 2002. Biodiversity and Conservation Priorities in the Cerrado Region, Pp 351-367 in *The Cerrados of Brazil: Ecology and Natural History of a Neotropical Savanna*, edited by Oliveira P.S. & R.J. Marquis. Columbia University Press, New York.
- Chapco W., N.M. Ashton, R.K. Martel, N. Antonishishyn & W.L. Crosby, 1992. A feasibility study of the use of random amplified polymorphic DNA in the population genetics and systematics of grasshoppers. *Genome* 35: 569-574.
- Chassin-Noria O., A. Abreu-Grobois, P.H. Dutton & K. Oyama, 2004. Conservation genetics of the east Pacific green turtle (*Chelonia mydas*) in Michoacan, Mexico. *Genetica* 121: 195–206.
- Cockerham C.C., 1969. Variance of Gene Frequencies. *Evolution*, 23: 72-84.
- Cockerham C.C., 1973. Analyses of gene frequencies. *Genetics*, 74: 679-700.

- Colli G.R., R. P. Bastos & A.F.B. Araújo, 2002. The character and dynamics of Cerrado herpetofauna, Pp 223-239 in *The Cerrados of Brazil: Ecology and Natural History of a Neotropical Savanna*, edited by Oliveira P.S. & R.J. Marquis. Columbia University Press, New York.
- Costa R.B. & A. Scariot, 2003. A Fragmentação Florestal e os Recursos Genéticos. In Costa, R.B. *Fragmentação Florestal e Alternativa de Desenvolvimento Rural na Região Centro-Oeste*. Editora da UCDB: Campo Grande.
- Crandall K. A., O. R. P. Bininda-Emonds, G. M. Mace & R. K. Wayne, 2000. Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution* 15: 290-295.
- Crozier R.H., 1997. Preserving the information content of species: genetic diversity, phylogeny and conservation worth. *Annual Review Ecology and Systematics* 28: 243-268.
- Diniz J.A.F., 1984. *Geografia na Agricultura*. Difel, São Paulo.
- Diniz-Filho J.A.F. & M.P.C. Telles, 2002. Spatial autocorrelation and the identification of operational units for conservation in continuous populations. *Conservation Biology* 16: 924-935.
- Diniz J.A.F., L.M. Bini, C.M. Vieira, M.C. de Souza, R.P. Bastos, D. Brandão & L.G. Oliveira, 2003. Spatial patterns in species richness and priority areas for conservation of anurans in the Cerrado region, Central Brazil. *Amphibia-Reptilia* 25(1): 63-75.
- Driscoll D.A., 1998. Genetic structure, metapopulation processes and evolution influence the conservation strategies for two endangered frog species. *Biological Conservation* 83: 43-54.
- Duellman W.E. & L. Trueb, 1994. *Biology of amphibians*. McGraw-Hill, New York.
- Eastel S., 1998. Range expansion and its genetic consequence in populations of the giant toad, *Bufo marinus*. *Evolutionary Biology* 23: 49-84.

- Eiten G., 1994. Vegetação do Cerrado, Pp 9-65. in Pinto, M.N. (coord.) Cerrado: caracterização, ocupação e perspectivas. 2ed. UnB/SEMATEC, Brasília.
- Eizirik E., 1996. Ecologia Molecular, genética da conservação e o conceito de unidades evolutivamente significativas. Brazilian Journal of Genetics, supplement 19: 23-29.
- Ellsworth D.L., D. Rittenhouse & R.L. Honeycutt, 1993. Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. Biotechniques, 14: 214-217.
- Epperson B.K., 2003. Geographical Genetics. Princeton University Press, New Jersey.
- Erlich H.A., D. Gelfand & J.J. Sninsky, 1991. Recent advances in the polymerase chain reaction. Science 252: 1643-1651.
- Ewers R.M., 2005. Are conservation and development compatible? Trends in Ecology and Evolution 20(4): 159.
- Excoffier L., 1993. Analysis of Molecular Variance: software ver. 1.55. Genetics and Biometry Laboratory. University of Genova. Distribuído pelo autor.
- Excoffier L., P. E. Smouse & J. M. Quattro, 1992. Analysis of Molecular Variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to Human Mitochondrial DNA restriction data. Genetics 131: 479-491.
- Fahring L., 2003. Effects of fragmentation on biodiversity. Annual Review of Ecology Evolution and Systematics 34: 487-515.
- Felsenstein J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39: 783-791.
- Fenster C.B., X. Vekemans & O.J. Hardy, 2003. Quantifying gene flow from spatial genetic structure data in a metapopulation of *Chamaecrista fasciculata* (Leguminosae). Evolution 57(5): 995-1007.
- Ferreira M.E. & D. Grattapaglia, 1998. Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética. EMBRAPA – CENARGEN, Brasília, DF.

- Ficetola G. F. & F. D. Bernardi, 2004. Amphibians in a human-dominated landscape: the community structure is related to habitat features and isolation. *Biological Conservation* 119: 219-230.
- Frankham R., J. D. Ballou & D. A. Briscoe, 2003. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Fraser D.J. & L. Bernatchez, 2001. Adaptive evolutionary conservation: Towards a unified concept for defining conservation units. *Molecular Ecology* 10: 2741-2752.
- Frost D.K., 1985. *Amphibian species of the world: a taxonomic and geographic reference*. Allen Press, Kansas.
- Frost D.K., 2004. *Amphibian species of the world 3.0*, an online reference. American Museum of natural History, New York. (Disponível em: <http://www.amnh.org>)
- Galinkin M. (ed.), 2003. *GeoGoiás: Estado Ambiental de Goiás 2002*. Fundação CEBRAC: PNUMA: SEMARH, Goiânia.
- Gillespie J. H., 1998. *Population genetics: a concise guide*. The Johns Hopkins Press, London.
- Global Amphibian Assessment, 2004. IUCN / Species Survival Commission / CI / CABS / Nature Service (Disponível em: <http://www.globalamphibians.org>)
- Goulão L., L. Cabrita, C.M Oliveira & J.M. Leitão, 2001. Comparing RAPD and AFLP<sup>TM</sup> analysis in discrimination and estimation of genetic similarities among apple (*Malus domestica* Borkh.) cultivars RAPD and AFLP analysis of apples. *Euphytica* 119: 259-270.
- Gray M.J., L.M. Smith & R. Brenes, 2004. Effects of Agricultural Cultivation on Demographics of Southern High Plains Amphibians. *Conservation Biology* 18(5): 1368-1377.
- Hadrys H., M. Balick & B. Schierwater, 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology* 1: 55-63.



- Haig S.M., J.M. Rhimer & D.G.Heckel, 1994. Population differentiation in randomly amplified polymorphic DNA of red-cock-aded woodpeckers *Picoides borealis*. *Molecular Ecology* 3: 581-595.
- Hedrick P.W., 2001. Conservation genetics: where are we now. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 629-638.
- Higgins K. & M. Lynch, 2001. Metapopulation extinction caused by mutation accumulation. *PNAS* 98(5): 2928-2933.
- Hillis D.M., C. Moritz & B.K. Mable, 1996. *Molecular Systematic*. Sinauer Associates: Massachusetts.
- Hitchings S. P. & T. J. C. Beebee, 1997. Genetic substructuring as a result of barriers to gene flow in urban *Rana temporaria* (common frog) population: implications for biodiversity conservation. *Heredity* 79: 117-127.
- Hödl W., 1990. Na analysis ecology of foam nest construction in the neotropical frog *Physalaemus ephippifer* (Leptodactylidae). *Copeia* 1990: 547–554.
- Holsinger K.E., 1999. Analysis of genetic diversity in geographically structured populations: a Bayesian perspective. *Hereditas* 130: 245–255.
- Holsinger K.E. & L.E. Wallace, 2004. Bayesian approaches for the analysis of population genetic structure: an example from *Platanthera leucophaea* (Orchidaceae). *Molecular Ecology* 13: 887-894.
- Holsinger K.E. & P.O. Lewis, 2003. HICKORY v. 1.0. Department of Ecology & Evolutionary Biology, The University of Connecticut. (Disponível em: [www/eeb.uconn.edu/](http://www/eeb.uconn.edu/) ).
- Holsinger K.E., P.O. Lewis & D.K. Dey, 2002. A Bayesian method for analysis of genetic population structure with dominant marker data. *Molecular Ecology* 11: 1157–1164.
- Houlahan J.E., C. Scott-Findlay, B.R. Schmidt, A.H. Meyer & S.L. Kuzmin, 2000. Quantitative evidence of global amphibian population declines. *Nature* 404: 752-755.

- IBGE, 1997. Censo Agropecuário 1995-1996, nº 25, Goiás. Fundação IBGE, Rio de Janeiro.
- IBGE, 2001, Censo Demográfico 2000, dados preliminares. Fundação IBGE, Rio de Janeiro.
- Jehle R., J.W. Arntzen, T. Burke, A. P. Krupa & W. Hödl, 2001. The annual number of breeding adults and the effective population size of syntopic newts (*Triturus cristatus*, *T. marmoratus*). *Molecular Ecology* 10: 839–850.
- Kajolner S., S.M. Sastad, P. Taberlet & C. Brochmann, 2004. Amplified fragment length polymorphism versus random amplified polymorphic DNA markers: clonal diversity in *Saxifraga cernua*. *Molecular Ecology* 13: 81–86.
- Kathrin P.L., A.S. Rand, U.G. Mueller & M.J. Ryan, 2003. Fine-scale genetic pattern and evidence for sex-biased dispersal in the túngara frog, *Physalaemus pustulosus*. *Molecular Ecology* 12: 3325-3334.
- Kimberling D.N., A.R. Ferreira, S.M. Shuster & P. Keim, 1996. RAPD marker estimation structure among isolated northern leopard frog population in the south-western USA. *Molecular Ecology* 5: 521-529.
- Klink C. A. & A. G. Moreira, 2002. Past and current human occupation, and land use, Pp. 69-88 in *The Cerrados of Brazil: Ecology and Natural History of a Neotropical Savanna*, edited by Oliveira, P.S. & R.J. Marquis. Columbia University Press, New York
- Kruskal J.B., 1964. Nonmetric multidimensional scaling: a numerical method. *Psychometrika*, 29(2): 115-129.
- Lampert K. P., A. S. Rand, U. G. Mueller & M.J. Ryan. 2003. Fine-scale genetic pattern and evidence for sex-biased dispersal in the túngara frog, *Physalaemus pustulosus*. *Molecular Ecology* 12: 3325–3334.
- Lande R., 1999. Extinction risks from anthropogenic, ecological, and genetic factors, Pp 1-22 in *Genetics and the Extinction of species*, edited by Landweber L.F & A.P. Princeton University Press, Princeton.

- Laurie M.V., 1975. Práticas de plantación de árboles en la sabana africana. FAO. Cadernos de fomento florestal, 19.
- Legendre P. & L. Legendre, 1998. Numerical Ecology. Elsevier, Amsterdam.
- Lessa E., 1990. Multidimensional analysis of geographic genetic structure. Systematics Zoology 39: 242-252.
- Lewis P.O. & A.A. Snow, 1992. Deterministic paternity exclusion using RAPD markers. Molecular Ecology 1: 155-160.
- Liu Z., C. Guan, F. Zhao & S. Chen, 2005. Inheritance and mapping of a restorer gene for the rapeseed cytoplasmic male sterile line 681A. Plant Breeding 124 (1): 5-8.
- Lynch M. & B.G. Milligan, 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. Molecular Ecology 3: 91-99.
- Manel S., M. K. Schwartz, G. Luikart & P. Taberlet, 2003. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. Trends in Ecology and Evolution 18: 189-197.
- Manly B.F.J., 1985. The Statistics of Natural Selection. Chapman & Hall, London.
- Manly B.F.J., 1986. Multivariate Statistical Methods: A Primer. Chapman & Hall, London.
- Manly B.F.J., 1997. Randomization, Bootstrap and Monte Carlo methods in biology. Chapman & Hall, London.
- Mantel N., 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Research 27: 209-220.
- Marsh D.M. & P.C. Trenham, 2001. Metapopulation dynamics and amphibian conservation. Conservation Biology 15: 40-49.
- Mesquita O.V., 1989. Agricultura. Pp 149-170, in Duarte A.C. (editor). Geografia do Brasil – Região Centro-Oeste. Fundação IBGE, Rio de Janeiro.

- Michelmore R.W., I. Paran & R.V. Kesseli, 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 88: 9828-9832.
- Miller M., 1997. Tools For Populations Genetic Analyses (TFPGA) 1.3: A windows program for analyses of allozyme and molecular population genetic data (Distribuído pelo autor).
- Miziara, F., 2000. Condições estruturais e opção individual na formulação do conceito de “fronteira agrícola”. Pp 273-289, in Silva L.S.D. *Relações cidade-campo: Fronteiras*. Editora da UFG, Goiânia.
- McPherson J.M., P.E. Eckstein, G.J. Scoles & A.A. Gajadhar, 1993. Variability of the random amplified polymorphic DNA assay among thermal cyclers, and effect of primers and DNA concentration. *Molecular and Cellular Probes* 7: 293-299.
- Murphy R.W., F.U. Jinzhong, D.E. Upton, T. Lema & Er-Mi Zhao, 2000. Genetic variability among endangered chinese giant salamanders, *Andrias davidianus*. *Molecular Ecology* 9:1539–1547.
- Myers N., R. A. Mittermeier, C. G. Mittermeier, G. B. A. Fonseca & J. Kent, 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.
- Nascimento L.B., R.R. Carvalho-Jr., H. Wogel, D.S. Fernandes & R.N. Feio, 2001. Reprodução e descrição do gerino de *Physalaemus rupestris* Caramaschi, Carcerelli & Feio, 1991 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). *Boletim do Museu Nacional* 450: 1-10.
- Neel M.C. & M.P. Cummings, 2003. Effectiveness of Conservation Targets in Capturing Genetic Diversity. *Conservation Biology* 17: 219-229.
- Newman R.A. & T. Squire, 2001. Microsatellite variation and fine-scale population structure in the wood frog (*Rana sylvatica*). *Molecular Ecology* 10: 1087–1100.
- Newton A.C., T.R. Allnutt, A.C.M. Gillies, A.J. Lowe & R.A. Ennos, 1999. Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. *Trends in Ecology and Evolution* 14: 140-145.

- Oliveira P.S. & R.J. Marquis, 2002. The Cerrados of Brazil: Ecology and Natural History of a Neotropical Savanna, edited by. Columbia University Press, New York.
- Padilla J.A., M. Blasco, J.C. Parejo, A. Rabasco, M.E. Sansinforiano & M. Martinez-Trancon, 2004. Genetic population structure of Spanish Chameleon: Implications for its conservation. *Israel Journal of Zoology* 50 (4): 355-366.
- Palo J.U., R.B. O'Hara, A.T. Laugen, A. Laurila, .R. Primmers & J. Merila, 2003. Latitudinal divergence of common frog (*Rana temporaria*) life history traits by natural selection, evidence from a comparison of molecular and quantitative genetic data. *Molecular Ecology* 12: 1963–1978.
- Palo J.U., D. Lesbarreres, D. S. Schmeller, C. R. Primmer & J. Merilä, 2004a. Microsatellite marker data suggest sex-biased dispersal in the common frog *Rana temporaria*. *Molecular Ecology* 13: 2865–2869.
- Palo J.U., D. S. Schmeller, A. Laurila, C. R. Primmer, S. L. Kuzmins and J. Merilä, 2004b. High degree of population subdivision in a widespread amphibian. *Molecular Ecology* 13: 2631–2644.
- Pérez T., J. Albornoz & A. Domínguez, 1998. An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. *Molecular Ecology*, 7: 1347-1357.
- Perez-Sweeney B.M., F.P. Rodrigues & D.J. Melnick, 2004. Metodologias moleculares utilizadas em genética da conservação. Pp 343-380 in Cullen Jr. L., R. Rudran & C. Valladares-Padua, editores. Métodos de estudos em biologia da conservação & manejo da vida silvestre. Editora UFPR e Fundação O Boticário de Proteção à Natureza, Curitiba.
- Pearse D.E. & K.A. Crandall, 2004. Beyond F-ST: Analysis of population genetic data for conservation. *Conservation Genetics* 5(5): 585-602.
- Phillips C.A., 1994. Geographic variation of mitochondrial DNA variants and the historical biogeography of the spotted salamander, *Ambystoma maculatum*. *Evolution* 48: 567-607.
- Pinto M.N., 1994. Cerrado. 2ª ed. Editora da UNB, Brasília.

- PNUD, 2003. Atlas do Desenvolvimento Humano no Brasil versão 1.0.1. Fundação João Pinheiro – FJP, Instituto De Pesquisa Econômica Aplicada – IPEA.
- Pressey R.L., 2004. Conservation planning and biodiversity: assembling the best data for the job. *Conservation Biology* 18: 1677-1681.
- Primack R.B. & E. Rodrigues, 2001. *Biologia da Conservação*. E. Rodrigues, Londrina.
- Primack R.B., 1998. *Essentials of Conservation Biology*. 2.ed. Sinauer Associates: U.S.A.
- Ranzani G., 1971. Solos do cerrado no Brasil. Pp 26-43 in Ferri M.G, editor. Simpósio sobre o cerrado. Edgard Blücher, EDUSP, São Paulo.
- Rezende A.V., 1998. Importância das matas de galeria: manutenção e recuperação. Pp 3-16 in Ribeiro J.F., editor. *Cerrado: matas de galeria*. EMBRAPA-CPAC, Planaltina.
- Ribeiro J.F. & B.M.T Walter, 1998. Fitofisionomias do Bioma Cerrado. Pp 89-152 in Sano, S.M. & S.P. Almeida. (editores). *Cerrado: ambiente e flora*. EMBRAPA-CPAC, Planaltina.
- Ribeiro J.F., C.E.L. Fonseca & J.C. Sousa-Silva, 2001. *Cerrado: caracterização e recuperação de matas de galeria*. EMBRAPA-Cerrados, Planaltina.
- Rizzini C.T., 1997. *Tratado de Fitogeografia do Brasil*. Âmbito Cultural Edições Ltda, Rio de Janeiro.
- Rodrigues F.M. & J.A.F. Diniz-Filho, 1998. Hierarchical structure of genetic distances: effects of matrix size, spatial distribution and correlation structure among gene frequencies. *Genetics and Molecular Biology* 21: 233-240.
- Rohlf F.J., 1989. *NTSYS-Pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*. Exeter publishers, New York.
- Rousset F., 2004. *Genetic Structure and Selection in Subdivided Population*. Princeton University Press, New Jersey.

- Routman E., 1993. Population structure and genetic diversity of metamorphic and paedomorphic population of toger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Journal of Evolutionary Biology* 6: 329-357.
- Rowe G., T.J.C. Beebee & T. Burke, 2000. A microsatellite analysis of natterjack, *Bufo calamita*, metapopulation. *Oikos* 88: 641-651.
- Rowe G., T.J.C. Beebee and T. Burke, 1998. Phylogeography of natterjack toad *Bufo calamita* in Britain: genetic differentiation of native and translocated population. *Molecular Ecology* 7: 751-760.
- Schweder M.E.E., R.G.Jr. Shatters, S.H. West & R.L. Smith, 1995. Effect of transition interval between melting and annealing temperatures on RAPD analysis. *Biotechniques* 38: 40-42.
- SEMARH (Secretaria do Meio Ambiente e dos Recursos Hídricos), 2004. I Workshop de Planejamento e Uso Sustentável dos Recursos Naturais do Estado de Goiás, 9 e 10 de dezembro. Goiânia.
- Shaffer H.B., G.M. Fellers, A. Magee & S.R. Voss, 2000. The genetics of amphibian declines: population substructure and molecular differentiation in the Yosemite Toad, *Bufo canorus* (Anura, Bufonidae) based on single strand conformation polymorphism analysis (SSCP) and mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Ecology* 9: 245–257.
- Sheng Y., W.H. Zheng, K.Q. Pei & K.P. Ma, 2004. Population genetic structure of a dominant desert tree, *Haloxylon ammodendron* (Chenopodiaceae), in the southeast gurbantunggut desert detected by RAPD and ISSR markers. *Acta Botanica Sinica* 46(6): 675-681.
- Silva, J.M.C., 2004. O conceito de hotspot como base para definição de áreas prioritárias para conservação. Pp 115-117, in Milano, M.S., L.Y. Takahashi & M.L. Nunes, editores. Unidades de Conservação: Atualidades e Tendências 2004. Fundação O Boticário de Proteção à Natureza, Curitiba.
- Simon P.W., 2005. Realizing value from Central Asian *Allium* germplasm collections. *Hortscience* 40(2): 309-310.

- Slatkin M., 1985. Gene flow in natural populations. *Annual Review in Ecology and Systematics* 16: 393-430.
- Smith E.J., T.Y. Geng, E. Long, F.W. Pierson, D.P. Sponenberg, C. Larson & R. Gogal, 2005. Molecular analysis of the relatedness of five domesticated turkey strains. *Biochemical Genetics* 43(1-2): 35-47.
- Smith M.A. & D.M. Green, 2005. Dispersal and the metapopulation paradigm in amphibian ecology and conservation: are all amphibian populations metapopulations? *Ecography* 28: 110-128.
- Smouse P.E., J.C. Long & R.R. Sokal, 1986. Multiple regression and correlation extensions of the Mantel test of matrix correspondence. *Systematic Zoology* 35: 627-632.
- Sneath P.H. & R.R. Sokal, 1973. *Numerical Taxonomy: the principles and practice of numerical classification*. W.H. Freeman, San Francisco.
- Sokal R.R. & G.M. Jacquez, 1991. Testing inferences about microevolutionary processes by means of spatial autocorrelation analysis. *Evolution* 45: 152-168.
- Sokal R.R., 1986. Spatial data analysis and historical processes. Pp 29-43, in Diday et al. (editors). *Data Analysis and Informatics IV*. Science publishers, Holland.
- Sokal R.R., P.E. Smouse & J.V. Neel, 1986. The genetic structure of a tribal population, the *Yanomama indians*. XV patterns inferred by autocorrelation analysis. *Genetics* 114: 259-287.
- Solé-Cava A.M., 2001. Biodiversidade molecular e genética da conservação. Pp 172-192, in Matioli, S. R. *Biologia Molecular e Evolução*. Holos Editora, Ribeirão Preto.
- Spiegelhalter D.J., N.G. Best, B.P. Carlin & A. Van der Linde, 2002. Bayesian measures of model complexity and fit. *Journal of the Royal Statistical Society Series B* 64: 483-689.
- Spielman D. B.W. Brook & R. Frankham, 2004. Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. *PNAS* 101(42): 15261-15264.



- Stuart S.N., J. S. Chanson, N.A. Cox, B.E. Young, A.S.L. Rodrigues, D.L. Fischman & R.W. Waller, 2004. Status and Trends of Amphibian Declines and Extinctions Worldwide. *Science* 306: 1783-1786.
- Sunnucks, P., 2001. Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution* 15(5): 199-2003.
- Telles M.P.C., A.S.G. Coelho, L.J. Chaves, J.A.F. Diniz-Filho & F.A. Valva, 2003. Genetic diversity and population structure of *Eugenia dysenterica* DC ('cagaiteira' - Myrtaceae) in Central Brazil: implications for conservation and management. *Conservation Genetics* 4: 685-695.
- Thomas J., N. Fineberg, G. Penner, C. McCartney, T. Aung, I. Wise & B. McCallum, 2005. Chromosome location and markers of Sm1: a gene of wheat that conditions antibiotic resistance to orange wheat blossom midge. *Molecular Breeding* 15(2): 183-192.
- Tomimatsu H., A. Hoya, H. Takahashi & M. Ohara, 2004. Genetic diversity and multilocus genetic structure in the relictual endemic herb *Japonolirion osense* (Petrosaviaceae). *Journal Of Plant Research* 117(1): 13-18.
- Uptmoor R., W. Wenzel, W. Friedt, G. Donaldson, K. Ayisi & F. Ordon, 2003. Comparative analysis on the genetic relatedness of *Sorghum bicolor* accessions from Southern Africa by RAPDs, AFLPs and SSRs. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 1316-1325.
- Vekemans X. & O.J. Hardy, 2004. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant population. *Molecular Ecology* 13: 921-935.
- Vencovsky R., 1992. Análise de variância de frequências alélicas. *Genetics and Molecular Biology* 15: 53-60.
- Watts P.C., J.R. Rouquette, J. Saccheri, S.J. Kemp & D.J. Thompson, 2004. Molecular and ecological evidence for small-scale isolation by distance in an endangered damselfly, *Coenagrion mercuriale*. *Molecular Ecology* 13(10): 2931-2945.
- Weir B.S. & C.C. Cockerham, 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.

- Weir B.S., 1990. Genetic data analysis - Methods for discrete population genetic data. Sinauer Associates, Sunderland/MA.
- Weir B.S., 1996. Genetic Data Analysis II. Sinauer Associates, Sunderland/MA.
- Welsh J. & M. McClelland, 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Research 18: 7213-7218.
- Whittaker R.J., M.B. Araújo, P. Jepson, R.J. Ladle, J.E.M. Watson & K.J. Willis, 2005. Conservation Biogeography: assessment and prospect. Diversity and Distribution 11: 3-23.
- Williams J.G.W., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski & S.V. Tingey, 1990. DNA Polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18: 6531-6535.

## APÊNDICE - 1

### UTILIZAÇÃO DE MARCADORES RAPD EM ESTUDOS POPULACIONAIS: UMA ABORDAGEM CIENCIOMÉTRICA

O rápido desenvolvimento das técnicas baseadas em DNA na década de 80 trouxe grandes avanços nos estudos de genética nas diversas áreas das ciências. Com o desenvolvimento da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), houve uma revolução na biologia molecular com a introdução de novas ferramentas, muito mais poderosas, para estudos genéticos. Uma dessas variações desta técnica é a tecnologia RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) que envolve a amplificação simultânea de vários locos anônimos no genoma utilizando primers de seqüência arbitrária (Williams et al. 1990; Ferreira & Grattapaglia 1998).

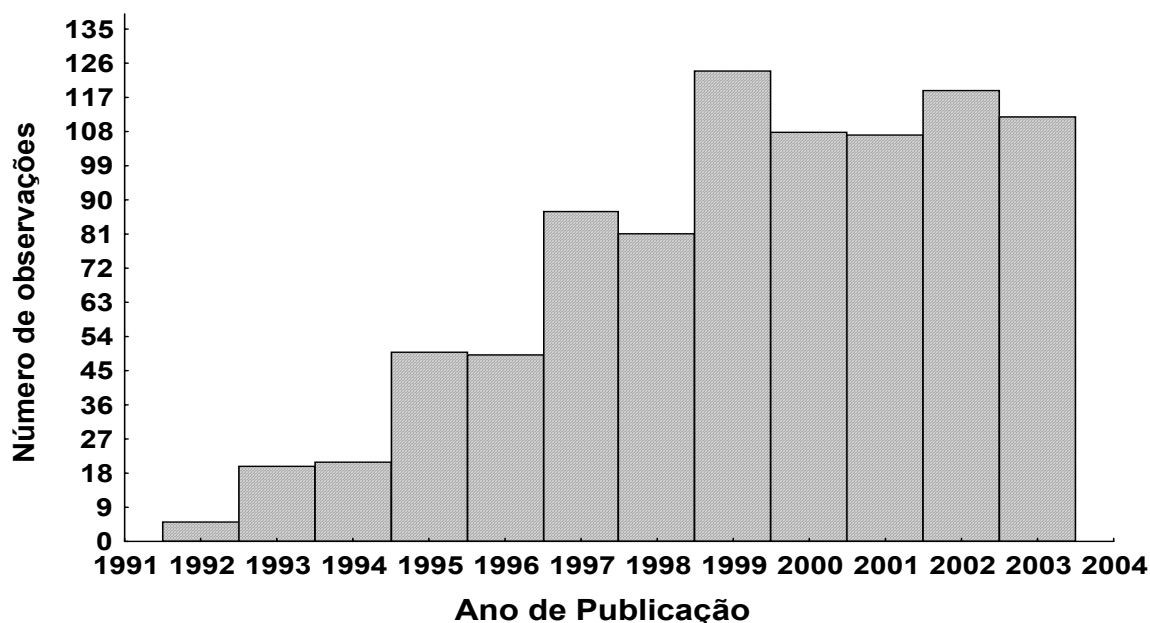
Com o objetivo de fazer um levantamento da representatividade do uso de marcadores RAPD em estudos populacionais, foi realizada uma avaliação cienciométrica dos trabalhos publicados até o ano 2003. Para tanto, realizou-se uma busca na página “*Institute for Scientific Information*” (ISI) utilizando a seguinte combinação de palavras-chave: RAPD and (*Population Structure or Genetic Variability or Genetic Divergence or Conservation Genetic*). Cerca de 300 artigos completos foram também obtidos utilizando o sistema “Periódicos CAPES” (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pois nos *abstracts* disponíveis no ISI não estavam todas as informações necessárias para as análises realizadas.

Dos trabalhos que se enquadravam no contexto de análise genética utilizando RAPD, as seguintes informações foram ordenadas em um arquivo do Excel: nome dos autores, título do artigo, nome do periódico, número de referências bibliográficas do artigo, número de vezes

que o artigo já foi citado, grupo responsável pela publicação do periódico, cidade e país de origem da publicação, número do ISSN, informações da referência de cada artigo (mês, ano, volume, número, número das páginas). Além disso, dos abstracts e artigos completos que continham estas informações, retirou-se o grupo taxonômico utilizado, a quantidade de *primers* RAPD, o número total de locos e o número de locos polimórficos.

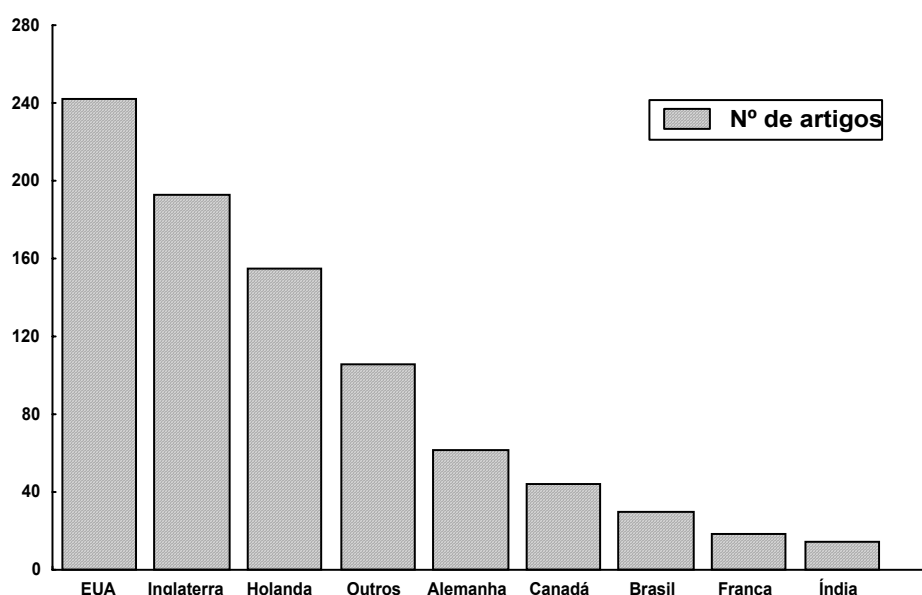
Dos 1.125 artigos obtidos da busca no método “*CrossSearch*” do ISI, que mencionavam uma ou mais das referidas palavras-chave, apenas 936 trabalhos de fato utilizaram o RAPD em estudos populacionais. Apesar de ter sido desenvolvida no início da década de noventa, os primeiros artigos utilizando a técnica de RAPD só começaram a aparecer em 1992. Este fato deve ter ocorrido, provavelmente, em virtude do lento processo que envolve a submissão e a aceitação dos artigos nos periódicos. Desde que a técnica foi desenvolvida, o número de artigos utilizando RAPD tem aumentado de maneira exponencial (Figura 1), uma vez que esses marcadores possibilitaram uma ampla detecção de variabilidade genética em vários pontos do genoma simultaneamente, o que ainda não era possível na época do seu desenvolvimento.

Com base na Figura 1 é possível perceber que esse crescimento exponencial ocorreu até 1999, e a partir deste ano o número de publicações tendeu a ficar estável com cerca de 100 artigos por ano. Esta estabilização provavelmente aconteceu devido ao surgimento de diversos outros marcadores moleculares até o final de década de 90, que possibilitaram diferentes níveis de precisão e robustez das informações genéticas, possibilitando uma diversificação dos estudos genéticos.



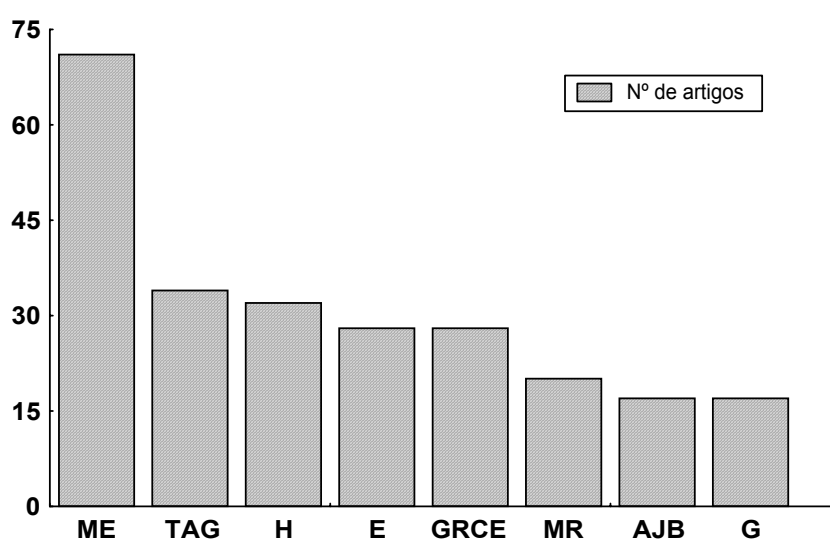
**Figura 1.** Distribuição da quantidade de artigos com RAPD publicados por ano.

Como o custo de editoração e publicação normalmente é muito elevado, existe uma concentração nas regiões mais ricas. Conseqüentemente, constatou-se que os países mais ricos são, de fato, responsáveis pela maioria das edições dos trabalhos com RAPD. Os Estados Unidos da América publicou um total de 242 artigos, seguido pela Inglaterra, Holanda, Alemanha, Canadá, Brasil, França e Índia (Figura 2). Países com menos de 10 publicações foram incluídos na categoria “outros”. Dentre eles estão: África do Sul, Austrália, Áustria, Coreia do Sul, Dinamarca, Hungria, Irlanda, Israel, Itália, Japão, Polônia, República Checa, República Popular da China, Sudão, Suíça, Rússia, Taiwan. Os países que publicaram apenas um artigo sobre RAPD foram a Argentina, Bélgica, Bulgária, Chile, Finlândia, Irlanda Malásia, Noruega, Singapura, Slovákia e Ucrânia.



**Figura 2.** Principais países responsáveis pela publicação de artigos com RAPD entre 1992 e 2004.

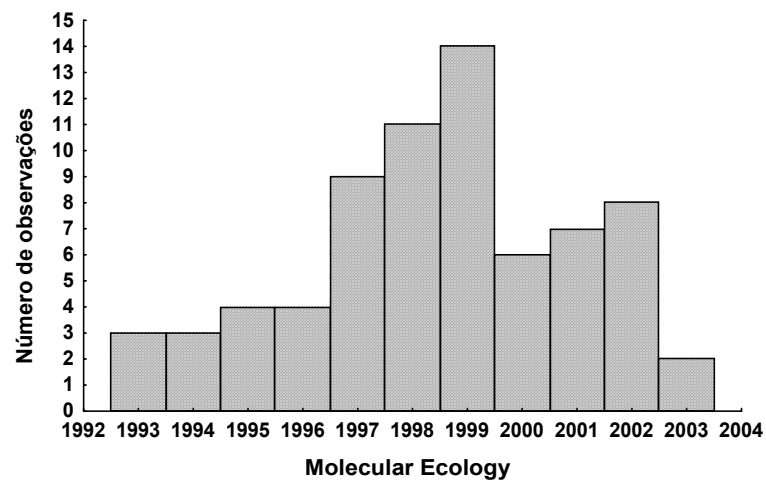
Um total de 282 periódicos foi responsável pela publicação dos 936 artigos com RAPD utilizados neste trabalho (Figura 3). Apenas 2,8% das revistas (*Molecular Ecology*, *Theoretical and Applied Genetics*, *Heredity*, *Mycological Research*, *Euphytica*, *Genetic Resources And Crop Evolution*, *American Journal Of Botany* e *Genome*) publicaram 247 artigos, representando 26% do total.



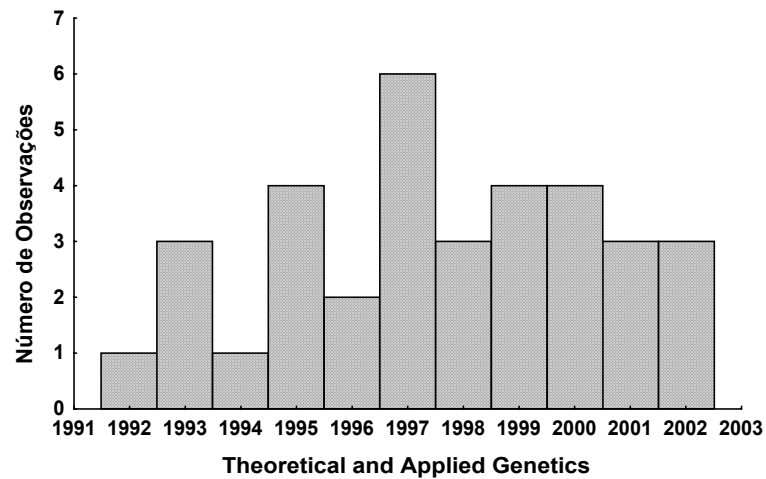
**Figura 3.** Principais periódicos responsáveis pela publicação de artigos com RAPD entre 1992 e 2004.

Os três periódicos que mais publicaram são, de fato, especializados em divulgação de trabalhos nas áreas de genética e de genética de populações. Analisando o número dessas publicações, por ano, nestas três revistas (Figura 4), pôde-se perceber que na *Molecular Ecology* houve um crescimento exponencial das publicações até 1999, no ano 2000 uma queda drástica e uma elevação nestes números até 2002, voltando a decrescer em 2003 (Figura 4A). Já na *Theoretical and Applied Genetics*, o número de publicações cresceu até 1997, no entanto este crescimento não foi regular, pois nos anos 1994 e 1996 menos artigos foram publicados. Em 1998 houve uma queda acentuada, seguida de uma ligeira elevação em 1999 e 2000, voltando para os mesmos índices de 1998 a partir de 2001 (Figura 4B). Analisando os dados da *Heredity* foi possível observar que não existe um padrão muito claro, mas que em 1995 e 1998 foram os anos que mais apareceram publicações com RAPD. A partir de 2000 os níveis de publicação ficaram mais ou menos constantes com uma leve queda em 2003 (Figura 4C).

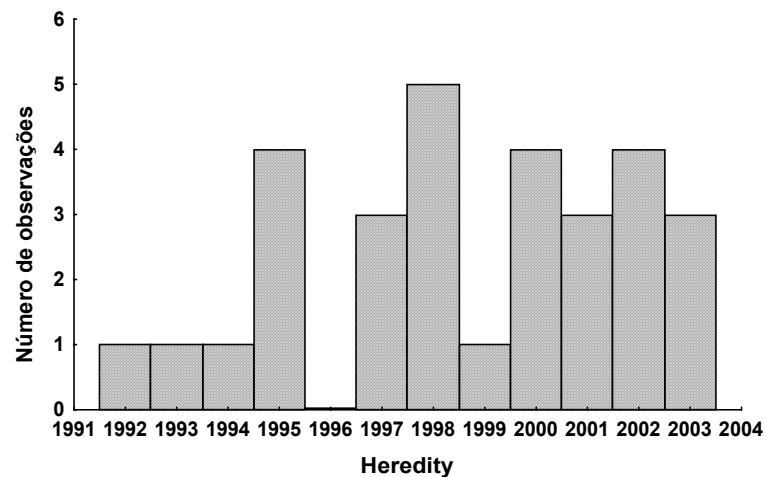
A)



B)



C)



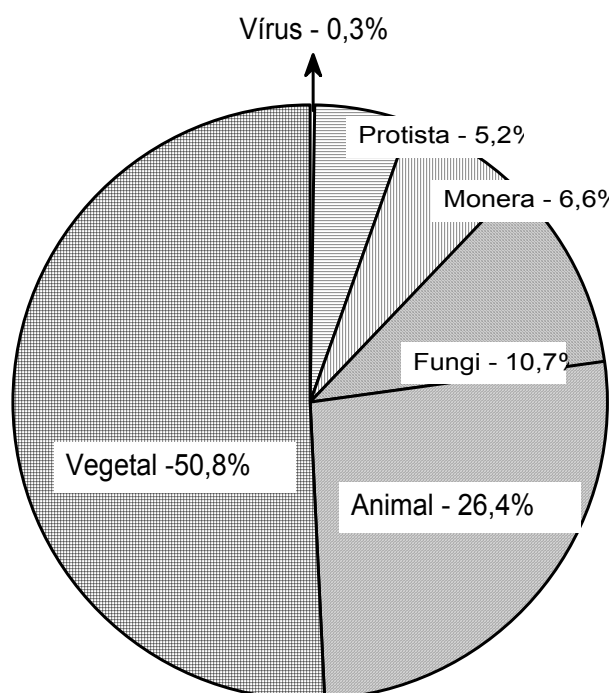
**Figura 4.** Distribuição de freqüência do número de artigos publicados por ano pelas revistas *Molecular Ecology* (A), *Theoretical and Applied Genetics* (B) e *Heredity* (C).



De uma maneira geral, pôde-se perceber que a partir de 1998 houve uma ligeira queda no número de artigos utilizando o RAPD em estudos populacionais, nas principais revistas da área. No entanto, é interessante ressaltar que a *Molecular Ecology*, revista que mais publicou artigos com RAPD (Figura 3), é a que apresentou a queda mais acentuada nas publicações a partir de 1998. Sabe-se que além do surgimento de um grande número de novos marcadores moleculares disponíveis hoje para estudar variabilidade genética, a partir de 1993 diversas dúvidas foram levantadas com relação à reprodutibilidade do RAPD (MacPherson et al. 1993; Meunier e Grimont 1993; Perez et al. 1998). Provavelmente, essas dúvidas levantadas juntamente com as novas possibilidades, contribuíram para essa queda nas publicações. No entanto, essa queda não aconteceu sistematicamente em todas as revistas porque outros trabalhos também apareceram defendendo a utilização do RAPD em estudos populacionais (Thompson et al. 2002; Silveira et al. 2003; Uptimur et al. 2003; Kjolner et al. 2004) e, portanto, muitos pesquisadores ainda trabalham com este marcador.

Com relação aos tipos de organismos utilizados nos trabalhos, pôde-se perceber que cerca de 50% dos artigos utilizam espécies vegetais, 26% animais e os outros 24% restantes utilizaram algum tipo de microorganismo (Figura 5). A grande representatividade dos vegetais nos trabalhos com RAPD provavelmente se deve ao fato de que estas espécies, na maioria das vezes, são mais acessíveis para as coletas e seus indivíduos podem ser encontrados em maiores quantidades nas populações. Essas características são interessantes e importantes em estudos de genética de populações. Além disso, existe um grande número de espécie vegetais cujas populações estão sofrendo com os efeitos da fragmentação dos habitats e conseqüentemente estão sob ameaça de extinção, devendo ser estudadas o mais rápido possível. Os animais apresentam níveis diferentes de dificuldades tanto para as coletas dos indivíduos quanto em relação às densidades populacionais. Os grandes mamíferos, por exemplo, apresentam dificuldades de coleta do material para a extração do DNA, tanto devido à captura ser complicada, quanto pela dificuldade de se

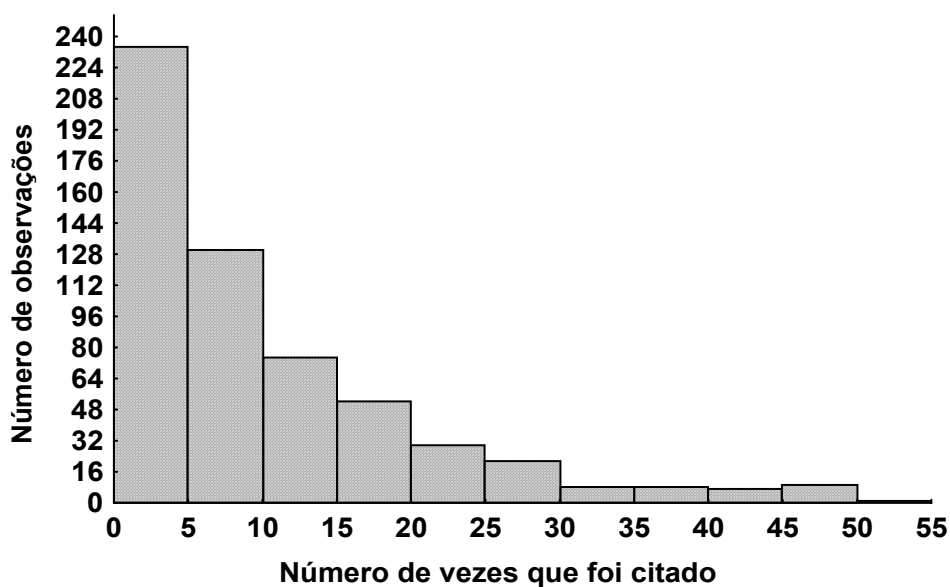
encontrar muitos indivíduos nas áreas remanescentes dos biomas. Outro exemplo seriam os insetos que normalmente ocorrem em grandes quantidades, mas a extração de DNA não é muito fácil. Por outro lado, os animais são mais fáceis de trabalhar do que os microorganismos que possuem grandes problemas taxonômicos e de identificação e que, normalmente, necessitam de cultura de células para a obtenção de material suficiente para a extração do DNA.



**Figura 5.** Porcentagem de artigos utilizando RAPD com os diferentes grupos de organismos.

Um dos bons indicadores do impacto que cada artigo tem na comunidade científica é o número de vezes com que ele foi citado por outros trabalhos. Nesse sentido, foi observado que a maioria dos artigos é citada menos de 30 vezes (Figura 6), para a construção do gráfico foram retirados os artigos citados mais de 50 vezes. De fato, a maioria dos artigos não é metodológica e sim apenas aplicações das técnicas, que já estão bem estabelecidas e disseminadas na área. No entanto, sete trabalhos mais antigos foram citados entre 105 e 306

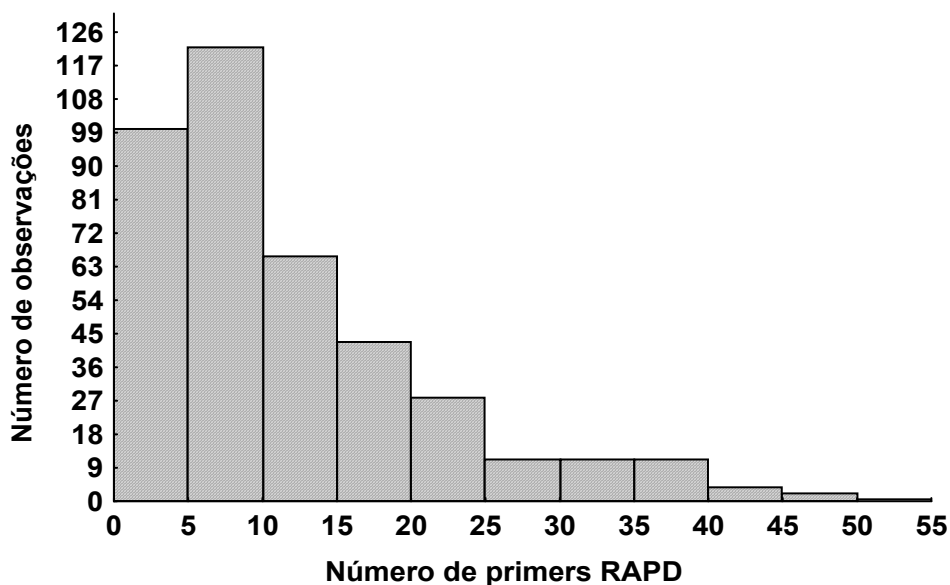
vezes (Chalmers et al. 1992; Kresovich et al. 1992; Tulsieram et al. 1992; Huff et al. 1993; Liu & Furnier 1993; Tibayrenc et al. 1993; Wang et al. 1993). Pode-se considerar que são artigos clássicos e, portanto, interessantes para quem pretende trabalhar com a utilização desta técnica.



**Figura 6.** Distribuição de frequência do número de vezes que cada artigo utilizando RAPD foi citado.

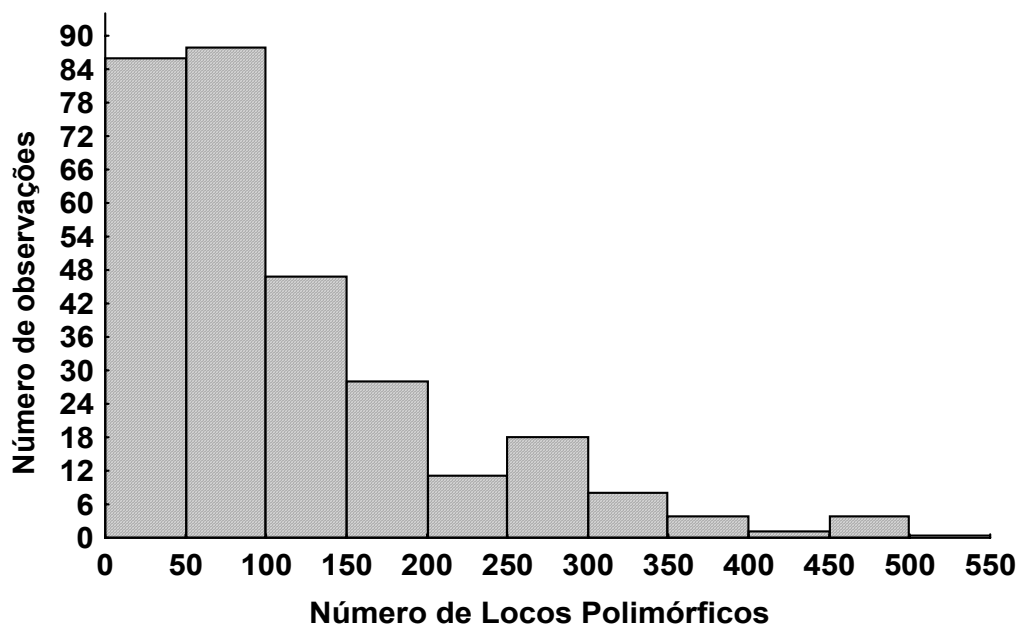
O número de *primers* é uma variável importante tanto do ponto de vista da quantidade e qualidade da informação genética a ser obtida, quanto em relação aos custos e mão de obra laboratorial. A maioria dos trabalhos utilizou até cerca de 25 *primers* (Figura 7), e os artigos com mais de 50 foram retirados para a construção do gráfico. Apenas quinze trabalhos utilizaram maiores quantidades de *primers*, chegando a um máximo de 1840 (Mudge et al. 1996). Esses números mais elevados são mais comuns em estudos de mapeamento e avaliação da ligação dos marcadores com características quantitativas (QTL's), como também é o caso de Boiteux et al. (2000) que trabalharam com 1000 e Caixeta et al. (2003) com 374 *primers*. Normalmente, os estudos de genética de populações, que pretendem realizar um levantamento prévio da variabilidade genética existente nas populações, não necessitam de grandes

quantidades de *primers* para se obter bons resultados. É claro que, para esta decisão, se devem levar em conta algumas características da história de vida da espécie a ser analisada.



**Figura 7.** Distribuição de frequência do número de *primers* RAPD usados em cada artigo.

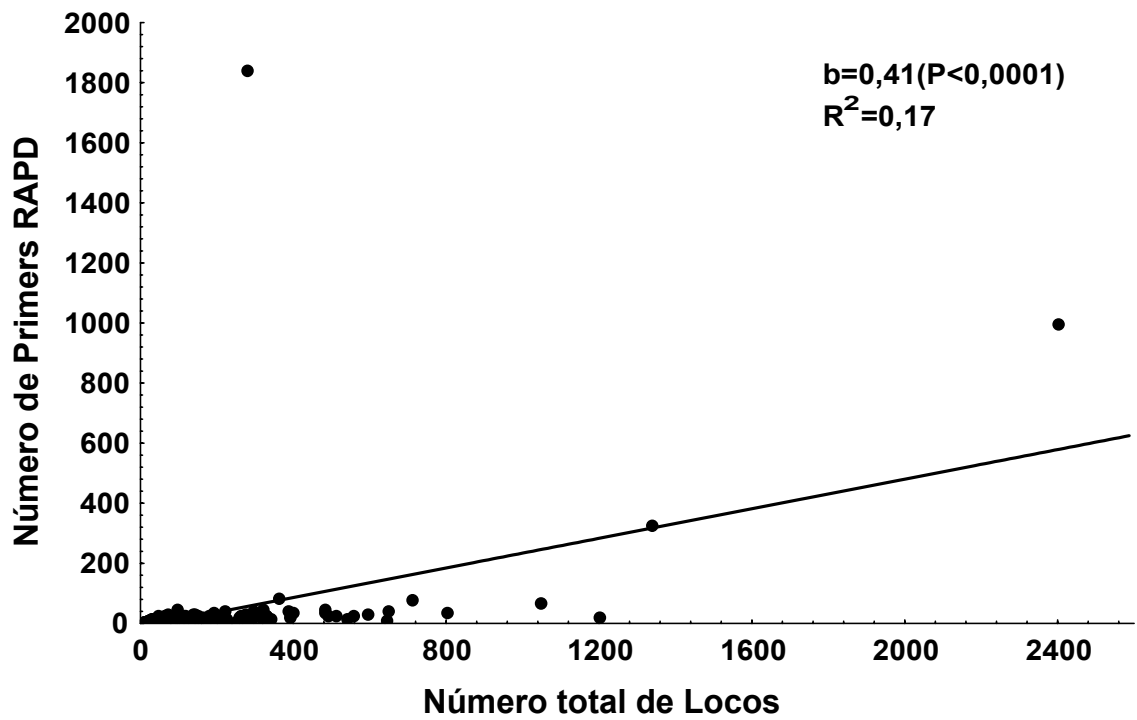
Uma medida de variabilidade genética importante para o estudo das populações é o número de locos e o número de locos polimórficos que cada *primer* produz. A maioria dos trabalhos obteve até cerca de 300 locos e 150 locos polimórficos (Figura 8). No entanto, existe uma variação muito grande, com trabalhos apresentando até 2400 locos e 781 locos polimórficos.



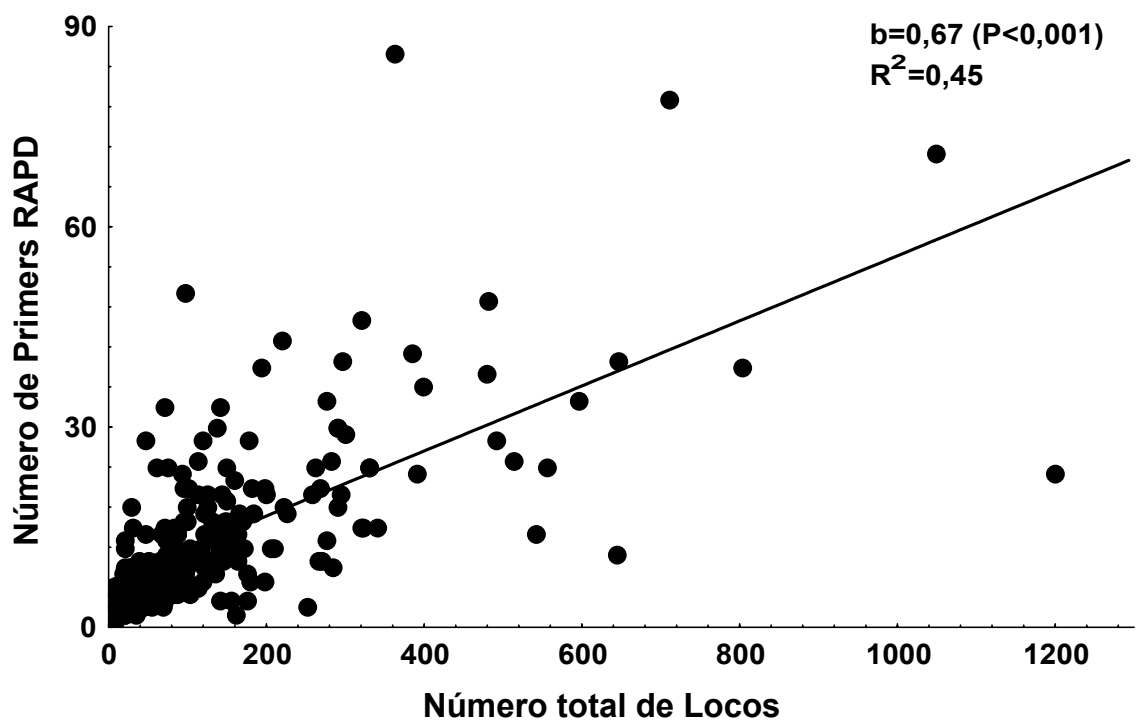
**Figura 8.** Distribuição de frequência do número de Locos polimórficos, por *primers* RAPD, obtido em cada artigo.

A análise de regressão entre o número de *primers* e o número de locos mostrou-se significativa com um coeficiente de determinação muito baixo ( $R^2 = 0,17$ ) indicando que muito pouco da variação no número de locos é explicada pelo número de *primers* utilizados nos trabalhos (Figura 9A). Entretanto, quando os dois trabalhos com maior número de locos e maior número de locos polimórficos, que são os mais discrepantes em relação aos demais, foram retirados da análise, o  $R^2$  passou a assumir um valor de 0,45 (Figura 9B), mostrando que, de fato, existe uma tendência em se obter maior número de locos quando se utiliza um maior número de *primers* nas análises.

A)



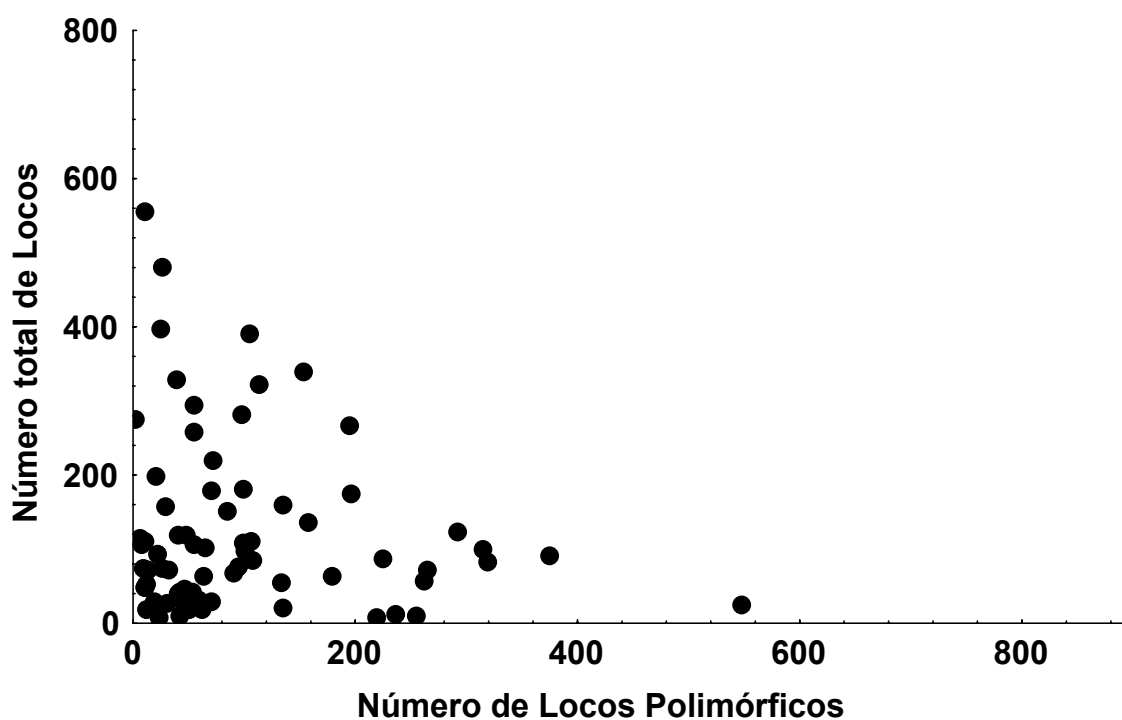
B)



**Figura 9.** (A) Análise de regressão simples do número de *primers* RAPD e o número de locos amplificados por *primer*. (B) Análise de regressão simples do número de *primers* RAPD e o número de locos amplificados por *primer*, retirando-se os dois artigos considerados com exceções.

Não parece existir uma relação muito clara entre o número de locos e o de locos polimórficos (Figura 10), ou seja, existem trabalhos que utilizaram muitos locos e que não encontraram uma grande variabilidade e, portanto, são poucos os locos polimórficos. É uma variável que é muito mais dependente na estrutura genética das populações e das características de história de vida das espécies do que do número de *primers* utilizado.

Com base neste levantamento cienciométrico, foi possível perceber que o RAPD, apesar das críticas sofridas, ainda tem sido utilizado com certa frequência pelos geneticistas de populações, sendo uma ferramenta molecular importante na avaliação de variabilidade genética das espécies.



**Figura 10.** Relação entre o número de locos amplificados e o número de locos polimórficos por *primer*.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- BOITEUX, L. S.; BELTER, J. G.; ROBERTS, P. A.; SIMON, P. W. RAPD linkage map of the genomic region encompassing the root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) resistance locus in carrot . *Theoretical and Applied Genetic*, Vol. 100, nº 3-4, p. 439-446, 2000.
- CAIXETA, E. T.; BORÉM, A.; FAGUNDES, S. A.; NIESTCHE, S.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Inheritance of angular leaf spot resistance in common bean line BAT 332 and identification of RAPD markers linked to the resistance gene. *Euphytica*. Vol 134, p.297–303, 2003.
- CHALMERS, K. J.; WAUGH, R.; SPRENT, J. I.; SIMONS, A.J.; POWELL, W. Detection of genetic-variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *G.maculata* using RAPD markers. *Heredity*, Vol. 69, p. 465-472, 1992.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares RAPD e RFLP em Análise Genética. Brasília: EMBRAPA - CENARGEN, 1995. 220p.
- HUFF, D. R.; PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. RAPD variation within and among natural populations of out crossing buffalograss [*Buchloe dactyloides* (Nutt) Engelm]. *Theoretical and Applied Genetics*, Vol. 86, nº 8, p.927-934, 1993.
- KJOLNER, S.; SASTAD, S.M.; TABERLET, P.; BROCHMANN, C. Amplified fragment length polymorphism versus random amplified polymorphic DNA markers: clonal diversity in *Saxifraga cernua*. *Molecular Ecology*, Vol. 13, p.81–86, 2004.
- KRESOVICH, S.; WILLIAMS, J. G. K.; MCFERSON, J. R.; ROUTMAN, E. J. Characterization of genetic identities and relationships of *Brassica oleracea* L. via a random amplified polymorphic DNA assay. *Theoretical and Applied Genetics*, Vol.85, p.190-196, 1992.
- LIU, Z.; FURNIER,G. R. Comparison of allozyme, RFLP, and RAPD markers for revealing genetic- variation within and between trembling aspen and big tooth aspen. *Theoretical and Applied Genetics*, Vol. 87, p.97-105, 1993.



- MACPHERSON, J.M.; ECKSTEIN, P.E.; SCOLES, G.J.; GAJADHAR, A.A. Variability of the random amplified polymorphic DNA assay among thermal cyclers, and effects of primer and DNA concentration. *Molecular and Cellular Probes*. Vol 7, p 293-299, 1993.
- MEUNIER, J.R.; GRIMONT, P.A.D. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Res. Microbiol*, Vol. 144, p.373-379, 1993.
- MUDGE, J.; ANDERSEN, W.R.; KEHRER, R.L.; FAIRBANKS, D.J. A RAPD genetic map of *Saccharin officinarum*. *Crop Science*, Vol. 36, n° 5, p.1362-1366, 1996.
- PEREZ, T.; ALBORNOZ, J.; DOMÍNGUEZ, A. An evaluation of RAPD fragments reproducibility and nature. *Molecular Ecology*, Vol.7, p.1347-1357,1998.
- SILVEIRA, S. R.; RUAS, P. M. ; RUAS, C. F. ; SERA, T.; CARVALHO, V. P.; COELHO, A. S. G. Assessment of genetic variability within and among coffee progenies and cultivars using RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology*. Vol. 26, n° 3, p.329-336, 2003.
- THOMPSON, J.R.; MARCELINO, L.A.; POLZ, M. F. Heteroduplexes in mixed-template amplifications: formation, consequence and elimination by “reconditioning PCR”. *Nucleic Acids Research*. Vol.30, n° 9, p.2083-2088, 2002.
- TIBAYRENC, M.; NEUBAUER, K.; BARNABE, C.; GUERRINI, F.; SKARECKY, D.; AYALA, F.J. Genetic-characterization of 6 parasitic protozoa - parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 90, n° 4, p.1335-1339, 1993.
- TULSIERAM L.K.; GLAUBITZ, J.C.; KISS, G.; CARLSON, J.E. Single tree GENETIC-linkage mapping in conifers using haploid DNA from megagametophytes. *Bio Technology*, Vol. 10, n° 6, p.686-690, 1992.

- UPTMOOR, R.; WENZEL, W.; FRIEDT, W.; DONALDSON G.; AYISI, K.; ORDON F.  
Comparative analysis on the genetic relatedness of Sorghum bicolor accessions from Southern Africa by RAPDs, AFLPs and SSRs. *Theor Appl Genet*, Vol. 106, p.1316-1325, 2003.
- WANG, G.; WHITTAM, T. S.; BERG, C. M. RAPD (Arbitrary primer) PCR is more sensitive than multilocus enzyme electrophoresis for distinguishing related bacterial strains. *Nucleic Acids Research*, Vol. 21, n° 25, p.5930-5933, 1993.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.K.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.T.  
DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, Vol. 18, n° 22, p.6531-6535, 1990.

# APÊNDICE - 2

#NEXUS

[! Sample dominant marker data file for Physalaemus cuvieri

]

begin alleles;

dimensions newpops nloci=126 npops=18 ;

dominant;

format labels missing=? ;

matrix

Pop\_1:

```

_1_ 01000010010101000000010010011101111111011001000111100110110111010100000011001100110011010010110010011000100100010101000010011
_2_ 0010101001010100000010010011110111110011101001110001110100011101010000100110101000101111110111011000100111011001001001101
_3_ 111001101100101000001001010011010010111001101100101100000010101000111010101010001010101001100000000000100100011010001011110
_4_ 1110010000101010000011000001101000111100111011111001010101110110111001010101101101110010100100001010011100011101000101000111101110
_5_ 11101001001010110000110100010011111111011101111011001011000011010101000010000001001010011000000010001000001011110000000001
_6_ 110110001100001000001000110101100111011010001101001000000100000011110010000011101010102????110????1?000000111010101000010110
_7_ 010010011110101101001110000010101011010011001111110001010111011010100000010010000010000011010000011010001110111010101001110
_8_ 111011000010101000001110010011100001111011101011110010001110111011010010100101001010111011100101000111011100100011011100100110010
_1_ 00001001011000000????????????1????00010001110111????????????????????????????????????????????????????????????0?????010001100011010001000100,

```

Pop\_2:

```

_2_ 10000000101000100010010101001010001100011110111????????????????????????0001010110111100001100001100100000010001010111????????????
_3_ 1101111010100111101100100101011001110101110011111010001001010111010000011011100011011101011001101000111011101010011101
_4_ 1000000001011011001001101110101110111001110100100102?1?????1?????1?001011100010010010010010010010010011??????1???1?00100000001
_5_ 111110010000010000110000001100101011000011101111110110001010101010101011101000010100110000110110001001100111010101000000110
_6_ 001010000111011000000011100101011010101110110101010011?????????1?1??1????100101010011011011011000001001000100101010101001010000
_7_ 0110101001010010000011110111111111110010010011111011000000010101011000010110011110011101110111011011001000110011110100010110
_8_ 110000111010010011111001001010010111011111011011100011101000101011101000100101110100010010111010111011000100001010100011001111100000010
_9_ ??????????????????????????????????????01010001111011?????????????????????????????????????????????????????????????????????????????????1??1?110000000011
_10_ 0110001111111101001000011110101100011000011101010111101100001010101111010100110001101010111111000101011111111111111001010100
_11_ 00000011110101000010000011010110001000011011110??1?00010010100000101010000101010001010011110100?????10????1??010011110011100000001001
_12_ 011000000001100000000100011010100101100011101010001000000100010110101001010011110110100010111110110011011001111111111010000101,

```

Pop\_3:

```

_1_ 11010001010101000101010110100101000110101111110001001000010001110101001101010100010011110010111011010011011001011110100001011
_2_ 11101010001111000110010100111101101110010100110110100111010010101010000111011010101001000001101111000000100001110110111000
_3_ ???1?1??11?1?1??00001000000110000010010010011001010?????????11?1?1?100000010010001101101001011001001000100011101000000101
_4_ 1101001011101101010011010001011101110000110001101000001010100001101001101010011011111010011100000010101111000001100
_5_ ?????????????1?????????????????????00101011101001????????????????????????????????????????????????????????????1?????????????????????10101010101
_6_ 00000001110100110001011010001001001011011110011111010100110001101110001000110111100001????11?????1?000010110011110101001010
_7_ 0100001101111001100110101110010101011001110001011111110011000101000001101110010010001110110110111110110011001111?100111010
_8_ 011000011110011101001000011111110110001110010111110101001001000001000010011101111010000010110101100100011111101001001100
_9_ 001001111011010100011111111101110011001110100111111011101111110100010010111010001011112?????10?????001000100111101001000110
_10_ 01100111101101010000111000111001100110011101001111101110111101101000010110000100010001000101010110110001000100011101001001100,

```

Pop\_4:

```

_1_ 010000100111011110001110110111011001101111101111001100000100001000111001001100100011001000010101110111001000100111100001101101
_2_ ?????????????????????????1?111??1?1?????11????????????????????????????????????????????????????????????1??11??01001000101
_3_ 1111111111001010001011011101101111101101101101101001000110010110000111101110101111001110000010011100100011100000010101
_4_ 110100110110101000001010011101010001101110101010111101101101100010111001000100100100001010110111110000110111011110000011010
_5_ 11011010000110000001001101110101100010100101010111101101100001010100110110010001001100000110011011000010001100111011010011
_6_ 100001000101100000001000011101000000101101010010011100000100000010101100101100110101001110000110111001001010110010000001011110
_7_ ?????????????????????1??1??1?????1?000001101101110??1?????????????1?1000000000000010110????????????1????000000100011100110011110

```

\_8\_00000101010000001000000010000011001101001101011110?? ??????????????1?00011000000101000101????????1????001000110011000001001101  
 \_9\_11101000110001000?????????1?1?1?1?01101111010010000000000010100000010010000001000000110001100111111001000101011100101110110  
 \_10\_100100101100100001000101111110111011101010011010????00001000010110101001000001010010001000101000110001001000100011000111111110,

Pop\_5:

\_1\_0100010011001000000001010111010101110011100101110010111001000010100101001010100111100101011010000010001011110010101111  
 \_2\_00001010111001000000010001111110101110010100100011111110001010110111011001101000111001100111010010110001000101011010000001100  
 \_3\_111111110111000010000000111011101110010110000111101111101000101100100101000010010000100100100010010001000100010001100100101110  
 \_4\_10010001110010000001010101010111011010101011110000011010010101000110010000011001010100101101001100010001110000001101  
 \_5\_10110010111011110001011011111110001011010101011100000001000000010100010100011010100101001011101101100100011001111110100101  
 \_6\_101101111010110010000000001100111101011101001111111????????????????1?0000000001110000111????????????0011001010111000101010  
 \_7\_111110111011010101000000001010111010111011101011100001100000000010100100011010011000010100001010001010001010001010001010001010  
 \_8\_01010100100010100000000101000101011101011000111000001010001010011000001001000100001000010001001101????????1??1100100010001101000100110  
 \_9\_0000001001001100000000000100111010010011000001?1?000000000000010100100010001001011101????????1????1001000110011000101000010  
 \_10\_00001011010010000000000010100101100000101101101110110101101000001011100000110000010000101??1??11??11001010101011110010110010,

Pop\_6:

\_1\_1011011010001000000010001011010010110110111000011001100101100110111011011010011000000101100111011000100110101111010010100  
 \_2\_010111101001110000000001001100010011110100101101101100001100001110101011100011000010000100111001111100010111001110100101001  
 \_3\_1101010011000000100000000110110110011111110111011111101110110111010000111101010100011000100110011011000100001110110010100  
 \_4\_11010100110000001000000011010101101001001100101101101111011001011100110101000001010001110111100001000110111010001010110  
 \_5\_10100001010100010110000010011111011101111001001100000010000011010000101010001011100010111100111011100100011101110101110100  
 \_6\_01000010101011010000100000110011111011100111001101010010000101101000100000010000100000001011011011101001111111001100110  
 \_7\_0001010110011010011001111111010110111010111000100011001101000000000001101000101001100000000110011101100000001000110000001100,

Pop\_7:

\_1\_00101010000010100000110100111101011010101111111011100111011100011010101110011000001010000101011111110000000100011101001100101  
 \_2\_01000011100101100001000000011001100010001110111111000001000000100010101000110001100111000010110100100110100101111001100101  
 \_3\_0101000100110110000001000110111100111010101010101100111000000100110010000001000100011111110100001000110010011110111001010  
 \_4\_011011011100000001101010110001010001100001000011011110001000000111010000001100100011000111111011010100000011000111101100101  
 \_5\_0000011101110000010001000010101010011111100001101011000101000011101011101010101010000011101101001010000011100111101001101010  
 \_6\_11000111010110001000101000110011100010111101101010000001000011110100010101001101111010101010101000010110111101001100001000  
 \_7\_110000000001100000001110000010011110010110011101010011011011011001101100011011000110011000110101111101010101110011100101  
 \_8\_011000100100110000001110010111111010011101101001011011000100100110001010110010001010101001101110010101110110010011001100  
 \_9\_00000011100110100000101101010101001011101101101101000101101110100010101000101011001110110100111001011100101110010111010  
 \_10\_0000100100010100000000110101101100100100111101011011100010010101101100010100001001010100000000111011001100010101111010100100  
 \_11\_0110110111110100010001010110111110101011110010101110001010110001110000001000100011111101101011001100011101110001011011011001100100,

Pop\_8:

\_1\_011110100100100000000101011011000001101101101101101101100100011011110101010110101011111010101011011011001100110011000010010111  
 \_2\_00010111010000000010010101101010000100110110011001110110001010101110011001110000010001010000010010001010001110011011011010100  
 \_3\_0101010011010000000001100010100111110101000110001001000010100111001000101111010010101110001000111101111001001000  
 \_4\_0101001001010000000000010010000110011110111110101011101001000111100100100001000100110111110110110110001100111000000101011  
 \_5\_0111001001010000000001110010000100101010110001010000101000110000100001000010110101100111001110011011001110010011000  
 \_6\_01010100010000000000000010101100010010111011110100001000000011110010010101100010111010101000110001101100110011100000110100  
 \_7\_0101001101000010100011110010101011001110010011100010101001010111110010010000000000111000011101111100101011101110001000001  
 \_8\_001100100100100000001010110101100111010111011000100011010100110111001001000111001001101010000111001101100110011100000011100  
 \_9\_0001001010010100000001000110100110111010101011011011010000010100101111101000000011?0101110100111011000110011101110000110110  
 \_10\_00010010010101010110110001100010101110101110111101100000001011011110010001010010011111110111101101010001000110011100000010011,

Pop\_9:

\_1\_1010101110101010010001000000111011101011101011001110000101001001011011010000101001101010101111011111000001110111101001100101  
 \_2\_0010010010010000100110001011011001101110101010001010101001101111001110000000001001101110111011010000000111111111010100100  
 \_3\_11011111001000000000110100000110100100111110001010000001010011101100110110111010000110101101001000000001001111100000100  
 \_4\_000001000001000000011000001001100010100001101110011010011001110111010101011000000101011110111010011000010110111????????1?  
 \_5\_11010101001000000000111100010010000111000010100011011001100110110010001001000100110000101100111000100111111001001001110  
 \_6\_0100010000101110000011101000001101110010101000010011001001000101101000001000000001010100000010101100000010011101010110101  
 \_7\_010001011110110000001100111010110011101101000010010001001000000010101010101000000100100000101100011001100100111101010110101  
 \_8\_001000101110100010000101000111111111001100100001000100001010100010011010110111100111100000001011111000100011001110001000100  
 \_9\_10100010101010001000110001001101001101110111011000100010011001110100110001????1??1??1??1????10000101001011000001101010110001011000  
 \_10\_0001010000100010000011010100011110111011101100100010110101101010000110010110100000110111110100101100000110011100001000101,

Pop\_10:

\_1\_111011110000100010000001000101110010100001110000001000110110000011000101001010000000001010011010001010001001100011110010101011  
 \_2\_1101111100100110010000101000011110010110101100011001000000100101101111001100000000101100101000110110010100101000111011101101010

\_3\_1110110000101000100011001100011100110100111101000010000101011001011010101011100010010110101010110111100101010011110110101010  
\_4\_111001001000100011000001011011010110100101110101111000111000001010101101010101001110111100101011101100010110011100101010110  
\_5\_1100001011100000000000110000101011010101101010101001101010000001101110001110100101011101011010011011110100110011111010001011  
\_6\_010010000101001100000010010011101111011110100011010001010001000001110001011010001010001000011100110110100011010111010001011  
\_7\_11011011011010100000000100010110110001101100010111111000101100101111010100010100101001101111011001010000101101011101001100110000  
\_8\_10000010101001100001100000011100100110100010110110001011001100001000010000110110110100111010101110011101010111001110110011010  
\_9\_0100000111010011000001110110110000111001011010000111000110000010110100001100000000010100001000101000101010101111010011010  
\_10\_0010110110011110000000001010111100101001011001010110000101010101110100100010100001001101100000010100011001010101101101000101

Pop\_11:

\_1\_11001011001000000000110100101010010110100111101000100000010001010100101000011010111000101000110001001100100010011110110001011  
\_2\_0000000011010011001000010010011000111010101010100010000101011010101000110100001000111001000010000000100011011110000001011  
\_3\_01000001010100100000101001101101100001100101010100011010011011010100000110011100101000110001000000001010010101001110110  
\_4\_00000001010100101000000101001010011100101011110101010111000011000011000011000001100110001001100110110011110100111010001110110  
\_5\_001011111011011000001100110110110111010101101010111001001100010101010000000010000010111110110011110100010111010001011101101  
\_6\_0000000110100111000010000101111010011011011110010111001000101101011110110100101000101000110111001100100101110110111011010  
\_7\_001000001010100001001011001101011101010001101100001011000010110010011010010011000111010110011101110101101001100011101010100010  
\_8\_011011111010101000001100011001111011110001111101010001010111001010110011110001100111010011101000000011011011101101101000010  
\_9\_10001111010100101011000100101010001010010011110110101110001010110010101000001100000010001101110111001000010011110111011000110  
\_10\_0100001001010100100010010000101100011010101110100100100111011010001000011100110110010000000001100110011011110101010  
\_11\_000100010101001100000111101001011011001110010101011000101010110001010001000111010011100011110011101010010010011110100110010  
\_12\_00000010011100001001010110101110001001011101001001011010010010110110000000000110101101100101010001100100011011110101010010  
\_13\_00000000110100110000010001100111010100101101101001000101100111100100011101010000010101101110111011001000100110100001001110  
\_14\_0000000101010011000010100110001110011010010010011100000000110011010100100001000101011011011100110011111001001111100100111110010100  
\_15\_0000000001010010011101001111000001001101001011101001100101111011010010010001000101011011101000110010001001010011101110100011001000001  
\_16\_0000000001010011000011000101100110000011011010111010010010101110110100000000101000001101000100110001001100011001101010101101  
\_17\_00100000010101000000010000000111011101011101010001000001010001100101000000100010111001101001010100001000110110011101001101110  
\_18\_000000010101001000000100010111110110110101011110100111010010101010010010001000100010001000100010001101101100110111011001110  
\_19\_000000001010010000110000011101110100010010110010010100110011101010000000110001100110001000001101110000001101110000010001110  
\_20\_000000001111000001000000001101101110100110011100010110011001110110011101000101000010100001001010000001010110011000110001111  
\_21\_0000000001010010000011110001111111000001111110100101000101010011011000010110010111010001110111011100100100110101100101101  
\_22\_000000010101001000000100101010110111010111001010101001000101001101011101000010011001101100010100111001001001101110110111000100  
\_23\_00000000010101000000100000101011001110101010101100100110010001011011101100011101001000001000111011001110100011101100010100111

Pop\_12:

\_1\_0000000001010100001000011110010110111110101011001001100101001010100010100000010011011011111110101000010101110010101011  
\_2\_0000000001010100001000000100111010001101111101101000000010001001000100100101010011100010110000101110010110000100100111010101111  
\_3\_0000000001010100110001111111001100010011010111000100000011000101010100100111000100101011001111111101001010011110110100110  
\_4\_????????????????0000100011110101?1110010101100??0000000100000101011000000001000000010101001010011100101100111101010100110  
\_5\_0000000001010100001000000001001100110110010101010??00100001010011110100000010000011101110000010100100000011100011101110100010  
\_6\_00000100010101000001000000011010001110011110000010111101001001101010100011100001000100000011000100110100010011110111000010  
\_7\_0000001111010110100001011010011100011011111011001011110100000101101100111101001100110000001111101100010101001111000001011  
\_8\_000000000101011000000100011011110100010101111100010101110101110101100100010001101001110111111001101000011010111001100100101  
\_9\_000000001111100000001001001111000001010101110010011101001101011110000010000101001001101011100000110011100000100111100100100  
\_10\_000101010100100000010110011001101011001100110011000010101011011010100100101001110000111010010000001010011110010101110  
\_11\_0100000111010100000111011101011010010111001010??1?00100101011111010010010100101001100100111100100110010010011111000001111  
\_12\_00000000010100101000001100010010000111011110010011?00100101011111000000000100001000011101110101000101100111010100010110011101010001011

Pop\_13:

\_1\_000000000101010010000101010100110100101010100101011111010111001010010000000100100111010001100000011011110011110111  
\_2\_00000001011100101000010000000110001110111110100110110110110101101010100000101000100000111101011011100000100111101010000111  
\_3\_0000000001010011100001110001001110101100110110001100101110101011110101010101100000111010101010110000011101111001001010110  
\_4\_0000000101010010100001000000010010001001101110001001010010011011101000001011000000101000100011010111101100001010001111010100010100011  
\_5\_?????????1?11??1?0000100000010101001011011111011011001110100101110001000000100100111000000100011100000010001110011001110  
\_6\_000000000101011000000001100001011101010101010101011001100100111010000010100001000000001000100011100000011011111010101110  
\_7\_000000010101010000000000100110011110010010101001010010101011100100000000111100100010101110001000000011011101100010001001  
\_8\_000000000101010000001100101000100010101100101011??00100110011101110000000010101000000000111000011001011110111101101010101  
\_9\_0000000011010100100100001100101110111010011101010??1?00100101000010101000010000010000110??0000110011101110100111101110100111101  
\_10\_0101001011001010100101110111011111011010111011010111011010111010101000011110101100000111010111000101101100000010001111010101010  
\_11\_0000000001010110000000111011111101111100111011??1?01010100110101110011011010100001100000??01??1??1??11001100100101101011011100,

Pop\_14:

\_1\_0000000101010000000110100110011000011000101010101010001101110111001001000001010001011010001110011000110010101111110011010110  
\_2\_1001010101100100001011010011101101100110101010111010100001010000101010001101101000001001111101111010110111011110100001011  
\_3\_?????????11?1??1??00000011111110110100101101111000100000000001110111100101000010011001001??1?11??00110011011000111000001110110

4\_000000011011011000010000101011111100011101010110010101001010101011100100111011000110011011101011010011100111001010001111  
 5\_?????????1??????0000100001011100100000010101011????00000101000010110000000001000100000001?1?????1110010001111110110101100  
 6\_????????1??11????1000001011111010011110101011010100110001010000101011100000000001011001101100011111111001010101111001011101  
 7\_000010100101010000001100011001111010001110101110010011001010011101100010111000100100110000001100101000100010001110000001001,

Pop\_15:

1\_0000001111110101101000000100110100101000110011010100001010110001011100000001010011000100101010010000000100110011111110101100  
 2\_01?????1??1??????0010000010100100101011011001001001010111011011000101100000001100011000111110110100011000100111110100101011  
 3\_0101010111010101000000001111010000100101100001111100001100100011101011010000000010100110011001101010000100110001001110001001111  
 4\_01110010100100010010010010000010010001011110000111100000100000011000001010000000000010101101100100111101110011111010101111  
 5\_011111000100100100100010010010010010001111011100101101001100101010011001001000110000000000110011111000100101101011011111011011  
 6\_010000010111001000000001100000111011011011011000101110101101011001101100001110011010011100100011011110101111101011110101100110  
 7\_010000000101001001001001111000011010011001100000101001010101110101101000000100010011110101110010011100000111001011011  
 8\_????????1??1??1?000000101000000111000101110011????00010110101110000001010000010001101111110011111011000010111011001011010  
 9\_110100000010100010110000111001010110110011010001100000001001001010111000000010101110101101111101111001100100000011111000101101  
 10\_00100001010110000000000110100100010000111010100000001011011000100010100010000100001110000000101000000111011000010001  
 11\_000111101101101000010001101101011001001101101101101000101010101011101010011000101011000111011010000110001101111000100101  
 12\_01101000010100000000010101010010001110101010001000000001110011111100000000000001100011111000000011000010001000000100100  
 13\_111110100101100000100000010111010111000101100001000001000001000110110001010100111001000001111101111011001010111001000111001  
 14\_0010101001110100100111101101001000000000110110010000001101001000000110101000010110101010011000110010110110111000110010111111001001101  
 15\_0101000001011000000000010000001100111000111000100000100111000011101010101001100011000101100010010110001010110001010100101101011011  
 16\_0000000001010110000100100110010101001000011001011110000000100010111101101000000010101000110110000110001110100011101110111001  
 17\_000000000101010000010010010101001101010110111011000000010011010100000001001101010010011001101101100101010000011001110100101  
 18\_00001000110110100001001011011001101110110111011000001001001101110101000000000000000011001011100101001001110010100100101  
 19\_10000010110001100010000010101100011001100110011????0000010011001011101010010100011000100100110100010111010110010110100101  
 20\_00001000010100000011000011101001010111000101110010000010100111001011110100101000010001101011111010111000100100111011011001101  
 21\_000100000101011100110100011010010111100011001011010101000100100111111010101000111001100100101110010101110010011101001010101,

Pop\_16:

1\_??????1111?1??1?110010000001110101011000100100110100010001011000010100100110100001000010010110110001000101000111110001101110  
 2\_?????????????????0011000000110001001100001100000???0000010100101010001000110100110110000011010001010001100001110101011110101  
 3\_?????????????????101100100111110101111000000100001000100010001110110000011001000000000110001000011000011101100100100110  
 4\_0010010001010010100101110101101011110001110100011001000101011011110110000001100100100000001110010000011100010001101011  
 5\_1111010011100000000101010011110011010011110101010001101000001001001101111001001101110001011101101000000110101110010010110  
 6\_0001000110100100000110110011011101100100111010110001000001000001010111000100011000100010000010111101111011110111101110110  
 7\_00000000111000100100001101111111010101011001110111101111010100100101011001110100111001000100101101100100111001110011011110,

Pop\_17:

1\_10000000011100000001110011000110111101110001011010000100000000101010110010000010100000011111010110010001100111101001101010  
 2\_1101101000001000000001010000101110111100110011100100110001010001010011010100001010001001010111011100101110011110110000100  
 3\_0000000001010010100000110001000100110110101110001110000000001010100001011100001001001010000000110010001011100111101000100100  
 4\_000000001000011000000100011010001011011001000101101101100011000011111000111000000100100010010010111010100111001101001011000  
 5\_001000001100010000000110000110010010111001101010??1?00001011000001010101010111011011000000100011010100010111011111010111000  
 6\_??????1?1?1?1????1????????????1????00101010100001000001011000000000001000011??11????????00000110001110010011010  
 7\_0011010011001110000001000000101010011001101101101101110010110010101100001001101111000001101111110111011010  
 8\_00001000010100000000110101110111011011100110101100000100001110101001001100110010110000011110110111000001100011000010111011  
 9\_000000000110001000000100000110111?10110100100100??000010000000010010111000011011000011011001001110111000001000101100011101010101  
 10\_1100000111011110100101100110101110110110101010??1?00001010000000010000011100010001001000001011011001100100010011110111000011  
 11\_00100001110110100010010001110000101010111111100001000010001100100101??1?100010110111100010001001111100010001001111100101101  
 12\_00101000110110100010111100110011101110011101010111000000000000001011000101101000110100010011011011100000010011110101101100  
 13\_00001110110110100000010010001011001101101110101101010000111111000110101010001000111011011000000000100111100011010111  
 14\_00000110110111000010100000010010011100011101110110??0000010000001010110001110001011111000011000000011011101010100101  
 15\_0010111011111101101100011011111101100011011001100110101100110011000101011000111100001110110100000000011011110101010111  
 16\_001000011011000000001000110101110100101110110111001001101110101100100110111010110010011001110110101000000110111110100101101  
 17\_11101100111110100000011000001000101011101100001001110010101101001000001100011001100001101100010010010000001001111110101010  
 18\_00001000111101010001011011111111001011101110101110101101010100001001000101001110111011000000010011110000011011000001101  
 19\_101110000110110010001101011111001101100110101110110100101010010111000011011100001010011111011101000000011011110001110101  
 20\_000010101111001000000110110001100011010001101011??00010011000110100000001010100101001000000110011100100000110011111100110011,

Pop\_18:

1\_00100110110010000101000111011111011001001111011001000000010010011100100101100100101001010001101110111100000100011111001100110  
 2\_00100011010110100000011001101101001101101010010101110001001111010000010010011010110000011011101101000001011110100100110  
 3\_0110111010110000000110011010100011111010101001110111001001110011100000010010010000011010101100000010101111010100110  
 4\_????????1?1?1????0000101111111011001101010001100100011001010111001010001001110101001110101001100000011001110100100110  
 5\_000011101111001000000110110011000111101001101100001000110010000000100100001101110010100100000010101001000000011011111001110110

```
_6_00101001010110100000010000011001101111111111000110010100110101111110000100010000101100010110101111100010011011110001100110  
_7_01111001011110100010010100011111011110110110101100010110001011100011110011100101000101100011011001101100000011011111001100110  
_8_011000011101100000000100000010010110101000010010001100110011001010111100111110010011001000010100111010000000100011111000101010  
_9_00110001110110000000010111001111000100100110101001110010101100101011001010111100100000111011001011010101011010000000110111101001101010  
_10_0111100111011000000001000010111100101010011110100110001001011011011001000010001101110010001111001111011000001101111101010100110  
_11_00101001110111100000010001001011100100110110110011001100000011010101100100000101111011001000111100011010000000100111101000000101  
_12_001010000101000000000100100111000111001000101111001100010011000000111100001010110110001000011001010001000000110011101000101001  
_13_00100001110110000000010100110001101100100111011011100010011000010110010010001011100110100001010101101100000011011101101110111  
_14_0010000111011000010001010100101101110000011011110110001011010010001011010100101011001000111010101000100100011011110111100111  
_15_000000010101000000010101001010110010001101110110011001100001000101100101010110010110101100100011111000110000110111101001000101;
```

```
end;
```

```
begin hickory;  
  set alphaF = 1.0 betaF = 1.0;  
  set alphaTheta = 1.0 betaTheta = 1.0;  
  set alphaPi = 1.0 betaPi = 1.0;  
  set nBurnin = 5000;  
  set nSample = 25000;  
  set thin = 5;  
  set prnwidth = 80;  
  set colwidth = 9;  
  [! set estimatePi reportPi;  
   set reportFrequencies; ]  
  set denomTheta = 100;  
  set denomF = 20;  
end;
```

## APÊNDICE - 3

LINK	Municípios	nº de munic. na conexão	ano médio	renda	população	nº de fragmentos	área dos fragmentos
1	Itaberaí	9	1868	254	27879	19	8992
	Caiapônia		1873	188	14673	175	
	Palestina de Goiás		1989	178	3307	32	32941
	Amorinópolis		1958	178	4145	14	4591
	Iporá		1948	232	31300	16	9141
	Moiporá		1958	176	2023	15	12151
	Córrego do Ouro		1953	163	2973	9	7776
	Sanclerlândia		1963	172	7530	5	1915
	Mossâmedes		1958	194	5798	17	9206
	médias ou somas		1941	193	99628	302	86713
2	Itaberaí	9	1868	254	27879	19	8992
	Damolândia		1958	172	2573	0	0
	Inhumas		1931	256	43897	5	2290
	Caturai		1958	167	4330	4	621
	Goianira		1958	179	18719	0	0
	Goiânia		1935	508	1093007	10	2520
	Aparecida de Goiânia		1963	202	336392	3	2832
	Professor Jamil		1993	204	3403	21	6359
	Piracanjuba		1869	251	23557	56	20713
	médias ou somas		1937	244	1553757	118	44327
3	Itaberaí	8	1868	254	27879	19	8992
	Damolândia		1958	172	2573	0	0
	Nova Veneza		1958	170	6414	4	495
	Nerópolis		1948	232	18578	4	2068
	Terezópolis de Goiás		1993	164	5083	8	819
	Bonfinópolis		1989	197	5353	6	928
	Leopoldo de Bulhões		1948	194	7766	15	5880
	Silvânia		1833	235	20339	60	44307
	médias ou somas		1937	202	93985	116	63489
4	Itaberaí	4	1868	254	27879	19	8992
	Goiás		1736	198	27120	65	
	Faina		1989	160	7419	41	91339
	Araguapaz		1982	214	7310	74	93764
			médias ou somas		1894	206	69728
5	Itaberaí	9	1868	254	27879	19	8992
	Avelinópolis		1963	221	2507	2	473
	Santa Bárbara de Goiás		1963	173	4963	3	450
	Campestre de Goiás		1963	158	3167	4	4899
	Aragoiânia		1958	199	6424	10	2216
	Varjão		1958	176	3519	17	15071
	Cromínia		1953	228	3660	15	5984
	Mairipotaba		1953	236	2403	16	7859
	Planaltina		1891	159	73718	21	
	médias ou somas		1941	200	128240	107	45944



	Itaberaí		1868	254	27879	19	8992
	Taquaral de Goiás		1963	186	3587	4	1337
	Santa Rosa de Goiás		1958	166	3548	5	986
<b>6</b>	Jesúpolis	6	1993	172	2123	4	634
	São Francisco de Goiás		1953	170	6028	8	2421
	Pirenópolis		1832	181	21245	32	
	médias ou somas		1928	188	64410	72	14370
<hr/>							
	Caiapônia		1873	188	14673	175	
<b>7</b>	Perolândia		1993	211	2791	32	13220
	Mineiros		1905	290	39024	167	
	médias ou somas	3	1924	230	56488	374	13220
<hr/>							
	Mineiros		1905	290	39024	167	
	Perolândia		1993	211	2791	32	13220
	Caiapônia		1873	188	14673	175	
	Piranhas		1953	191	12287	69	53542
	Arenópolis		1982	170	3999	27	28604
	Diorama		1958	159	2498	30	10917
	Montes Claros de Goiás		1963	194	7991	83	53727
<b>8</b>	Jaupaci	14	1958	169	3154	21	13190
	Fazenda Nova		1953	167	7093	32	26031
	Jussara		1958	212	20034	145	
	Itapirapuã		1958	151	10856	81	30663
	Matrinchã		1989	161	4520	38	29936
	Faina		1989	160	7419	41	91339
	Araguapaz		1982	214	7310	74	93764
	médias ou somas		1958	188	143649	1015	444933
<hr/>							
	Mineiros		1905	290	39024	167	
	Jataí		1882	305	75451	166	83451
<b>9</b>	Aparecida do Rio Doce		1993	219	2402	15	4504
	Quirinópolis		1943	243	36512	69	34745
	médias ou somas	4	1931	264	153389	417	122700
<hr/>							
	Mineiros		1905	290	39024	167	
	Perolândia		1993	211	2791	32	13220
	Caiapônia		1873	188	14673	175	
	Piranhas		1953	191	12287	69	53542
	Arenópolis		1982	170	3999	27	28604
<b>10</b>	Montes Claros de Goiás	11	1963	194	7991	83	53727
	Jussara		1958	212	20034	145	
	Santa Fé de Goiás		1989	157	4083	38	21743
	Aruanã		1958	193	5095	76	
	Mozarlândia		1963	203	11186	58	34159
	Nova Crixás		1980	189	11061	185	
	médias ou somas		1956	200	132224	1055	204995

	Mineiros		1905	290	39024	167	
	Perolândia		1993	211	2791	32	13220
	Caiapônia		1873	188	14673	175	
	Piranhas		1953	191	12287	69	53542
	Arenópolis		1982	170	3999	27	28604
	Montes Claros de Goiás		1963	194	7991	83	53727
<b>11</b>	Jussara	13	1958	212	20034	145	
	Santa Fé de Goiás		1989	157	4083	38	21743
	Aruanã		1958	193	5095	76	
	Mozarlândia		1963	203	11186	58	34159
	Nova Crixás		1980	189	11061	185	
	Mundo Novo		1980	154	8109	72	63666
	São Miguel do Araguaia		1958	222	22793	248	
	médias ou somas		1958	198	163126	1375	268661
<hr/>							
	Caiapônia		1873	188	14673	175	
	Piranhas		1953	191	12287	69	53542
	Arenópolis		1982	170	3999	27	28604
	Diorama		1958	159	2498	30	10917
	Montes Claros de Goiás		1963	194	7991	83	53727
	Jaupaci		1958	169	3154	21	13190
<b>12</b>	Fazenda Nova	12	1953	167	7093	32	26031
	Jussara		1958	212	20034	145	
	Itapirapuã		1958	151	10856	81	30663
	Matrinchã		1989	161	4520	38	29936
	Faina		1989	160	7419	41	91339
	Araguapaz		1982	214	7310	74	93764
	médias ou somas		1960	178	101834	816	431713
<hr/>							
	Caiapônia		1873	188	14673	175	
	Rio Verde		1854	340	116552	167	76184
<b>13</b>	Montividiu	4	1989	383	7736	25	9529
	Quirinópolis		1943	243	36512	69	34745
	médias ou somas		1915	289	175473	436	120458
<hr/>							
	Caiapônia		1873	188	14673	175	
	Rio Verde		1854	340	116552	167	76184
	Montividiu		1989	383	7736	25	9529
	Santo Antônio da Barra		1993	169	4052	11	4164
<b>14</b>	Acreúna	8	1989	250	18301	55	26426
	edealina						
	Mairipotaba		1953	236	2403	16	7859
	Planaltina		1891	159	73718	21	
	médias ou somas		1935	246	237435	470	124162
<hr/>							
	Piracanjuba		1869	251	23557	56	20713
<b>15</b>	Bela Vista de Goiás	3	1896	199	19210	21	6746
	Silvânia		1833	235	20339	60	44307
	médias ou somas		1866	228	63106	137	71766

	Piracanjuba		1869	251	23557	56	20713
	Cristianópolis		1953	253	2924	15	3257
	Pires do Rio		1930	311	26229	44	25340
<b>16</b>	Orizona	6	1906	246	13067	53	29018
	Luziânia		1833	210	141082	87	
	Cristalina		1916	221	34116	75	
	médias ou somas		1901	249	240975	330	78328
<hr/>							
	Piracanjuba		1869	251	23557	56	20713
	Professor Jamil		1993	204	3403	21	6359
<b>17</b>	Mairipotaba	4	1953	236	2403	16	7859
	Planaltina		1891	159	73718	21	
	médias ou somas		1927	212	103081	114	34931
<hr/>							
	Piracanjuba		1869	251	23557	56	20713
<b>18</b>	Morrinhos	4	1871	349	36990	84	35075
	médias ou somas		1870	300	60547	140	55788
<hr/>							
	Goiatuba		1938	340	31130	47	19987
	Morrinhos		1871	349	36990	84	35075
	Caldas Novas		1911	352	49660	40	60590
<b>19</b>	Pires do Rio	6	1930	311	26229	44	25340
	Ipameri		1870	215	22628	133	
	Cristalina		1916	221	34116	75	
	médias ou somas		1906	298	200753	423	140992
<hr/>							
	Goiatuba		1938	340	31130	47	19987
	Bom Jesus de Goiás		1963	241	16257	23	11456
	Itumbiara		1909	289	81430	54	11676
<b>20</b>	inaciolândia	6					
	gouvelândia						
	Quirinópolis		1943	243	36512	69	34745
	médias ou somas		1938	278	165329	193	77864
<hr/>							
	Goiatuba		1938	340	31130	47	19987
	Morrinhos		1871	349	36990	84	35075
<b>21</b>	Joviânia	5	1958	326	6904	7	2822
	Aloândia		1953	226	2128	3	243
	Planaltina		1891	159	73718	21	
	médias ou somas		1922	280	150870	162	58127
<hr/>							
	Silvânia		1833	235	20339	60	44307
	Abadiânia		1953	168	11452	19	40800
<b>22</b>	Corumbá de Goiás	4	1875	175	9679	25	51529
	Cocalzinho de Goiás		1993	138	14626	25	
	médias ou somas		1914	179	56096	129	136636
<hr/>							
	Silvânia		1833	235	20339	60	44307
	Vianópolis		1948	355	11300	18	11811
<b>23</b>	Luziânia	4	1833	210	141082	87	
	Cristalina		1916	221	34116	75	
	médias ou somas		1883	256	206837	240	56118

<b>24</b>	Silvânia		1833	235	20339	60	44307
	Abadiânia	3	1953	168	11452	19	40800
	Pirenópolis		1832	181	21245	32	
	médias ou somas		1873	195	53036	111	85107
<b>25</b>	Cocalzinho de Goiás		1993	138	14626	25	
	Corumbá de Goiás		1875	175	9679	25	51529
	Santo Antônio do Descoberto	6	1982	142	51897	10	76373
	Alexânia		1958	169	20047	11	49499
	Luziânia		1833	210	141082	87	
	Cristalina		1916	221	34116	75	
	médias ou somas		1926	176	271447	233	177401
<b>26</b>	Cocalzinho de Goiás		1993	138	14626	25	
	Mimoso de Goiás		1989	117	2801	19	95523
	Vila Propício	4	1997	109	4492	39	92580
	Niquelândia		1833	210	38573	222	
	médias ou somas		1953	144	60492	305	188103
<b>27</b>	Cocalzinho de Goiás		1993	138	14626	25	
	Padre Bernardo		1963	163	21514	35	
	Água Fria de Goiás	6	1989	143	4469	31	
	Planaltina		1891	159	73718	21	
	São João d'Aliança		1953	193	6736	65	
	médias ou somas		1958	159	121063	177	0
<b>28</b>	Cocalzinho de Goiás		1993	138	14626	25	
	Pirenópolis	4	1832	181	21245	32	
	Corumbá de Goiás		1875	175	9679	25	51529
	médias ou somas		1900	165	45550	82	51529
<b>29</b>	São João d'Aliança		1953	193	6736	65	
	Água Fria de Goiás		1989	143	4469	31	
	Planaltina		1891	159	73718	21	
	Formosa	6	1843	231	78651	81	
	Brasília		1960	605	2051146		
	Cristalina		1916	221	34116	75	
	médias ou somas		1925	259	2248836	273	0
<b>30</b>	Cristalina cabeceiras		1916	221	34116	75	
	Formosa		1843	231	78651	81	
	Vila Boa		1993	127	3287	39	55057
	Alvorada do Norte	8	1963	151	7560	44	66974
	Sítio d'Abadia		1850	97	2681	22	75643
	Damianópolis		1958	87	3303	12	14337
	Mambaí		1958	96	4838	26	50797
	médias ou somas		1926	144	134436	299	262808

	Cristalina		1916	221	34116	75	
	Orizona		1906	246	13067	53	29018
	Pires do Rio		1930	311	26229	44	25340
	Palmelo		1953	220	2309	5	367
<b>31</b>	Santa Cruz de Goiás	8	1947	262	3470	28	43461
	Caldas Novas		1911	352	49660	40	60590
	Rio Quente		1989	379	2097	10	10357
	Morrinhos		1871	349	36990	84	35075
	médias ou somas		1928	292	167938	339	204208
<hr/>							
	Nova Crixás		1980	189	11061	185	
	Mozarlândia		1963	203	11186	58	34159
<b>32</b>	Araguapaz	4	1982	214	7310	74	93764
	Crixás		1953	170	14673	124	
	médias ou somas		1970	194	44230	441	127923
<hr/>							
	Niquelândia		1833	210	38573	222	
<b>33</b>	São João d'Aliança	3	1953	193	6736	65	
	Água Fria de Goiás		1989	143	4469	31	
	médias ou somas		1925	182	49778	318	0
<hr/>							
	Niquelândia		1833	210	38573	222	
	Uruaçu		1931	193	33530	69	96347
	campinópolis						
	Campos Verdes		1989	143	8057	10	8455
<b>34</b>	Santa Terezinha de Goiás	8	1963	159	12015	39	19942
	Uirapuru		1993	125	3043	40	33963
	Nova Crixás		1980	189	11061	185	
	Crixás		1953	170	14673	124	
	médias ou somas		1949	170	120952	689	158707
<hr/>							
	Niquelândia		1833	210	38573	222	
	São João d'Aliança		1953	193	6736	65	
	Flores de Goiás		1963	112	7514	78	
<b>35</b>	Alvorada do Norte	7	1963	151	7560	44	66974
	Buritinópolis		1993	69	3383	10	6772
	Damianópolis		1958	87	3303	12	14337
	Mambaí		1958	96	4838	26	50797
	médias ou somas		1946	131	71907	457	138880
<hr/>							
	Niquelândia		1833	210	38573	222	
<b>36</b>	Vila Propício	3	1997	109	4492	39	92580
	Pirenópolis		1832	181	21245	32	
	médias ou somas		1887	167	64310	293	92580

	Niquelândia		1833	210	38573	222	
	Uruaçu		1931	193	33530	69	96347
	Campinorte		1963	168	9641	22	48563
	Mara Rosa		1953	154	11939	42	51216
	Amaralina		1997	89	3074	38	59089
<b>37</b>	Mutunópolis	10	1958	166	3958	28	17882
	Porangatu		1948	296	39593	90	
	Bonópolis		1997	148	2598	65	61566
	Novo Planalto		1989	149	3432	34	45384
	São Miguel do Araguaia		1958	222	22793	248	
	médias ou somas		1953	180	169131	858	380047
	Quirinópolis		1943	243	36512	69	34745
	Bom Jesus de Goiás		1963	241	16257	23	11456
<b>38</b>	Goiatuba	5	1938	340	31130	47	19987
	Joviânia		1958	326	6904	7	2822
	Planaltina		1891	159	73718	21	
	médias ou somas		1939	262	164521	167	69010
	Mambaí		1958	96	4838	26	50797
	Damianópolis		1958	87	3303	12	14337
<b>39</b>	Alvorada do Norte	5	1963	151	7560	44	66974
	Flores de Goiás		1963	112	7514	78	
	São João d'Aliança		1953	193	6736	65	
	médias ou somas		1959	128	29951	225	132108
	São Miguel do Araguaia		1958	222	22793	248	
<b>40</b>	Mundo Novo	3	1980	154	8109	72	63666
	Nova Crixás		1980	189	11061	185	
	médias ou somas		1973	188	41963	505	63666
	São Miguel do Araguaia		1958	222	22793	248	
	Novo Planalto		1989	149	3432	34	45384
	Bonópolis		1997	148	2598	65	61566
	Porangatu		1948	296	39593	90	
	Santa Tereza de Goiás		1963	190	4697	17	16074
	Formoso		1963	170	5589	17	31661
	Campinorte		1963	168	9641	22	48563
	Campinaçu		1982	136	3707	31	
<b>41</b>	Colinas do Sul	16	1989	126	3702	25	
	Alto Paraíso de Goiás		1953	203	6182	41	
	São João d'Aliança		1953	193	6736	65	
	Flores de Goiás		1963	112	7514	78	
	Simolândia		1989	112	6219	11	25292
	Alvorada do Norte		1963	151	7560	44	66974
	Buritinópolis		1993	69	3383	10	6772
	Mambaí		1958	96	4838	26	50797
	médias ou somas		1970	159	138184	824	353083
	Planaltina		1891	159	73718	21	
<b>42</b>	Morrinhos	2	1871	349	36990	84	35075
	médias ou somas		1881	254	110708	105	35075

