

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

Kelly Cordeiro Spena

**Análise da estruturação genética de duas populações de  
*Eleutherodactylus parvus* (Anura, Leptodactylidae) com o uso de  
DNA mitocondrial como estratégia para a conservação**

Mogi das Cruzes SP

2006

Universidade de Mogi das Cruzes

Kelly Cordeiro Spena

**Análise da estruturação genética de duas populações de  
*Eleutherodactylus parvus* (Anura, Leptodactylidae) com o uso de  
DNA mitocondrial como estratégia para a conservação**

Área de Concentração: Biológica

Orientador: Prof. Dr. Paulo Christiano de Anchietta Garcia

Mogi das Cruzes, SP

2006

## FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Spena, Kelly Cordeiro

Análise da estruturação genética de duas populações de *Eleutherodactylus parvus* (Anura, Leptodactylidae) com o uso de DNA mitocondrial como estratégia para a conservação / Kelly Cordeiro Spena. -- 2006.

54 f.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Mogi das Cruzes, 2006.

Área de concentração: Ambiental

Orientador : Prof. Dr. Paulo C. A. Garcia

1. Genética de populações 2. Seqüenciamento 3. Citocromo b 4. Padrões morfológicos I. Título II. Garcia, Paulo C. A.

CDD 576.58

*Para Vovô...*

*Que teve que partir na metade dessa  
jornada mas que onde quer que esteja  
está me acompanhando...*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força da Evolução.

À CAPES e à FAEP, pelo financiamento concedido ao meu trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Garcia pela minha primeira ida ao campo. Pelo convite. Pelos dois últimos anos.

Aos meus pais (Edson e Regina), pelo investimento, amor, carinho, conselhos, companheirismo. Sem vocês eu não teria cumprido todas essas etapas. Amo Vocês!

A minha irmã, avós e demais familiares, por todo apoio e força que me dão. Também por ter agüentado toda essa distância física e mental. Obrigada!

Com todo meu amor, agradeço a pessoa que mais me acompanhou nessa jornada. Ricardo Ildefonso de Campos. Deu-me carinho, amor, apoio, me fez companhia, me deu conselho, um ombro, alguns “*parvus*”... Alguns meses antes de começar essa jornada, o destino te colocou no meu caminho e desde então você tem me acompanhado em todos os meus passos. Essa dissertação é tão minha quanto sua. Obrigada Honey! Te Amo muito!

Não posso deixar de agradecer a todas as pessoas que me ajudaram em campo (e muitas vezes fora dele também). Bianca Berneck, Carolina Costa, Rogério Cordeiro, Magno Segalla, Fábio, Natacha, Luís Felipe, Thaís, Juliana, Deibs, Magna... Desculpe se esqueci de alguém, não foi por mal...

A minha amiga que me acompanha desde a graduação, Renata Pacheco. Por todos esses anos... Pela “estadia”. E o mais importante, por ter me apresentado meu amor!

Àquelas pessoinhas que me ajudaram muitas vezes, Alexandre G. Franchin (pelo mapa), Ronan C. Costa (pelos anfíbios), Bruno (pelos conselhos) e... ainda mais: por toda energia despendida com a minha dissertação, pelas “noites afora”, “dias adentro”, pelo ombro amigo, conselhos, dicas e protocolos. Valeu, meus grandes amigos !!!!

Sou também muito grata a todos os laboratórios que tiveram, de alguma forma, participação na minha dissertação:

- Laboratório de Genômica Funcional e Estrutural da Universidade de Mogi Cruzes: Prof. Dr. Luiz Roberto Nunes, Profa. Dra. Regina Costa de Oliveira. Obrigada pelo espaço, pelo equipamento, pelas dicas e por tudo mais que fizeram por mim, pelo meu trabalho e pelas “minhas rãzinhas”... Vocês ajudaram a construir uma parte da minha vida!

Aos integrantes do laboratório: Vivian, Fabiana, Amanda, Giane, Dani Leite, Flávia, Carla, Marcus, Maristela, Roberta, Daiene, Deibs, Dani Maria... Aos agregados: Neilce, Fernando e Fernanda. Por tudo o que fizeram por mim. Pelo carinho, pela ajuda, dicas,

sequenciamento, piadas, e-mails, pelos lanchinhos, afogado... Enfim, por todos os dias, por todas as palavras...

- Ao Laboratório de Genética de Peixes da Universidade de Mogi das Cruzes. Ao Prof. Dr. Alexandre Hilsdorf, pelas dicas, ajudas e ensinamentos nesses dois últimos anos.

Pela Cristiane, Sara, Juliana, Tatiana que me ajudaram de alguma forma. Thanks!

- Ao Departamento de Biologia Celular da Unicamp. À Profa. Dra. Shirlei M. Recco Pimentel, pelas dicas e pela hospitalidade. Ao Prof. Dr. Odair Aguiar Júnior, pelas tardes de ensinamentos, pelos e-mails, pelos protocolos. Obrigada por tudo!

Aos demais integrantes do laboratório que me ajudaram direta ou indiretamente.

- Ao Laboratório de Ecologia e Sistemática de Anuros Neotropicais da Universidade Federal de Uberlândia. Ao Prof. Dr. Ariovaldo Giaretta e à Profa. Dra. Kátia Gomes Facure, pelo espaço, pelos artigos, pelos conselhos, dicas, identificações e hospitalidade. Obrigada!

Obrigada todos aqueles que não citei, mas que de uma maneira ou de outra estiveram presentes nesses dois últimos anos. Beijão a todos!

## RESUMO

A taxonomia molecular pode analisar aspectos que não são reconhecidos morfológicamente podendo até revelar espécies crípticas. Conhecer os níveis de fluxo gênico entre as populações em áreas fragmentadas é importante para determinar em que grau a fragmentação está impedindo a troca genética entre as populações, assim como nos dar subsídios para a implantação de estratégias de manejo para evitar endogamia. No presente estudo, escolhemos como objeto de estudo, uma espécie pertencente ao grupo dos anfíbios, anuros conhecida como *Eleutherodactylus parvus*. Esta espécie foi escolhida por ser uma espécie de solo, exclusivamente florestal. Os indivíduos coletados apresentaram um evidente polimorfismo cromático dorsal, que determina dois padrões bem definidos. Os objetivos do presente trabalho foram: 1 - Avaliar o potencial da técnica de seqüenciamento do gene citocromo b na identificação de polimorfismos genéticos populacionais em *E. parvus*, 2 - Identificar se os indivíduos de *Eleutherodactylus parvus* podem representar um caso de espécie críptica (biodiversidade nominal), revelando-se duas espécies diferentes, conforme os padrões fenotípicos observados e/ou populações amostradas; 3 - Inferir o grau de divergência genética entre as duas populações de *E. parvus* amostradas. O estudo foi realizado em duas Unidades de Conservação, localizadas em áreas serranas de Mata Atlântica: Parque Natural Municipal da Serra Francisco Afonso de Melo – Chiquinho Veríssimo e a RPPN Parque das Neblinas. Extraímos amostras de fígado e músculo dos indivíduos analisados e amplificamos o gene citocromo b (DNA mitocondrial) através da técnica de PCR. Um total de 20 indivíduos de *E. parvus* foram seqüenciados, sendo 10 pertencentes ao Parque das Neblinas, e 10 pertencentes a Serra do Itapety. Deste total cinco representavam o Padrão cromático I e 5 o Padrão cromático II para cada localidade. Com a utilização do programa Arlequin 2.0, foram efetuados teste de Variância Molecular (AMOVA) sobre duas situações: Os padrões morfológicos e as localidades. As Análises de AMOVA demonstraram que as duas populações encontram-se altamente estruturadas geneticamente ( $F_{st} = 0,78$  e  $p < 0,01$ ), indicando que a variação genética entre elas é significativa. Por outro lado, foi encontrado um baixo índice de fixação ( $F_{sc} = 0,04$ ,  $p = 0,46$ ) entre os indivíduos que possuíam os diferentes padrões morfológicos dentro da mesma localidade. Isso demonstra que indivíduos com diferentes padrões morfológicos possuem uma baixa divergência genética. As duas populações em estudo estão isoladas pela Bacia Hidrográfica do Rio Tietê, que provavelmente se tornou uma barreira à dispersão de *E. parvus*. Isso pode ter ocorrido devido ao fato de que *E. parvus*, é uma espécie dependente de ambientes florestais sendo que os indivíduos desta

espécie podem ter sido isolados por uma matriz não florestal formada pelo surgimento da bacia do Rio Tietê. Para esse gênero, a presença de vários padrões morfológicos dentro da mesma espécie parece ocorrer em várias espécies. Pode-se concluir então que a técnica de seqüenciamento do gene citocromo b foi eficiente na identificação de duas populações de *E. parvus* isoladas entre si em duas reservas de Mata Atlântica. Além disso, aparentemente indivíduos de *E. parvus* estudados não representam um caso de espécie críptica.

**Palavras-chave:** Genética de Populações, seqüenciamento, citocromo b, padrões morfológicos.



## ABSTRACT

The molecular taxonomy can analyze aspects that can't be recognized morphologically and even can reveal cryptic species. To evaluate the levels of gene flow among the populations in fragmented areas it's important to determine the degree of the fragmentation and if it's intercepting the genetic exchange among the populations, as well as giving us subsidies for the implantation of handling strategies to avoid endogamy. The objectives of the present work were: 1 - to evaluate the sequencing technique efficiency of the gene citocrome b in the identification of population genetic polymorphisms in *E. parvus*, 2 - Identify if the individuals of *Eleutherodactylus parvus* can represent a case of cryptic species (nominal biodiversity), revealing two different species, according to the observed phenotypes patterns; 3 - Inferring the degree of genetic divergence among the two populations of *E. parvus* sampled. The study was accomplished in two highland Atlantic Forest Units of Conservation: Parque Natural Municipal da Serra Francisco Afonso de Melo – Chiquinho Veríssimo e a RPPN Parque das Neblinas. We extracted liver and muscle of the thigh of all the especimens to amplificate the gene cythocrome b mitochondrial DNA. A sum of 20 individuals of *E. parvus* were amplificated, 10 belongs to Parque das Neblinas, and 10 belongs to Serra do Itapety. Five of them represented the chromatic Pattern I and 5 the chromatic Pattern II inside each place. Analyses of AMOVA demonstrated that the two populations are highly genetically structured ( $F_{st} = 0,78$  and  $p < 0,01$ ). The two populations in study are isolated for Hydrographic Basin of Rio Tietê that probably became a barrier to the dispersion of *E. parvus*. That might have happened due to the fact that *E. parvus*, is a dependent species of forest environments and the individuals of this species might have been isolated for a no forest matrix formed by the appearance of Rio Tietê's Basin. On the other hand, it was found a low fixation index ( $F_{sc} = 0,04$ ,  $p = 0,46$ ) among the individuals that hold the different chromatic patterns inside of the same place. For this genus, the presence of several chromatic patterns inside of the same species seems to happen in several species. We can conclude that the technique of sequence of the gene citocrome b was efficient in the identification of two populations of *E. parvus* isolated amongst them in two Parks of Atlantic forest (Parque das Neblinas and Serra do Itapety). Besides, apparently the studied individuals of *E. parvus* doesn't represents a case of cryptic species.

**Keywords:** Population genetics, sequencing, citocrome b, morfological pattern.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Resultados das coletas de anfíbios, mostrando o número total de *E. parvus* coletados e o número de indivíduos que foram obtidos material para a extração de DNA (Fígado e/ou músculo da coxa) .....20
- Tabela 2:** ANOVA de três fatores comparando o comprimento rostro-cloacal de *E. parvus* entre a Serra do Itapety e a Serra das Neblinas (Local), macho e fêmea (Sexo) e padrões dorsais (Padrão) .....27
- Tabela 3:** AMOVA (Análise de variância Molecular) entre padrões morfológicos e populações utilizando todos os indivíduos seqüenciados.....33
- Tabela 4:** AMOVA (Análise de variância Molecular) entre padrões morfológicos e populações sem a utilização do 4 indivíduos com DNA discrepante .....34

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1:</b> Esquema gráfico mostrando a organização do DNA mitocondrial .....   | 16 |
| <b>Figura 2:</b> Medida do Comprimento Rostro – Cloacal (CRC) feita em todos os indivíduos de <i>E. parvus</i> amostrados .....  | 21 |
| <b>Figura 3:</b> <i>Eleutherodactylus parvus</i> exemplificando o padrão I .....   | 22 |
| <b>Figura 4:</b> <i>Eleutherodactylus parvus</i> exemplificando o padrão I .....   | 22 |
| <b>Figura 5:</b> <i>Eleutherodactylus parvus</i> exemplificando o padrão II .....  | 23 |
| <b>Figura 6:</b> <i>Eleutherodactylus parvus</i> exemplificando o padrão II .....  | 23 |
| <b>Figura 7:</b> <i>Eleutherodactylus parvus</i> . Exemplo do seu sitio de vocalização .....   | 26 |
| <b>Figura 8:</b> Média e erro padrão do comprimento rostro-cloacal de fêmeas e machos de <i>E. parvus</i> de acordo com os padrões morfológicos dorsais 1 e 2 .....  | 27 |
| <b>Figura 9:</b> Média e erro padrão do comprimento rostro-cloacal de fêmeas e machos de <i>E. parvus</i> coletados na Serra do Itapety e no Parque das Neblinas .....   | 28 |
| <b>Figura 10:</b> Gel de agarose, representando extração de DNA. Nessa ordem aparecem nos pocinhos: (A) Marcador $\lambda$ Hind III; indivíduos: 1.1.107; 1.1.136; 1.1.146; 1.1.147; 1.1.155; 1.1.156; 1.2.177; 1.2.178; 1.1.180; 1.1.181; 1.1.182; 1.1.212; Marcador Ladder 123. (B) Marcador Ladder 123; indivíduos: 1.1.107; 1.1.136; 1.1.146; 1.1.147; 1.1.155; 1.1.156..... | 29 |
| <b>Figura 11:</b> Gel de agarose mostrando o resultado do gradiente de temperatura dos primers MVZ36 e MVZ55. O primeiro poço contém o marcador $\lambda$ Hind III, o último poço foi o controle e os demais poços seguem com as seguintes temperaturas respectivamente: 48,0°C; 48,3°C; 48,9°C; 50,0°C; 51,4°C; 53,1°C; 55,2°C; 56,9°C; 58,2°C; 59,1°C; 59,8°C; 60,0°C.....     | 30 |

**Figura 12:** Gel de agarose mostrando o resultado da amplificação. O poço 1 contém o marcador  $\lambda$  Hind III, indivíduos: 1.1.107; 1.1.136; 1.1.147; 1.1.155; 1.1.156; 1.2.177; 1.2.216; 2.1.259; 2.1.260; 2.1.261; 2.1.263; 2.2.264; 2.2.265; 2.2.266; 2.2.267; 2.2.268 .....31

**Figura 13:** Gel de agarose mostrando o resultado da amplificação. O poço 1 contém o marcador  $\lambda$  Hind III, indivíduos: 1.1.107; 1.1.136; 1.1.146; 1.1.147; 1.1.155; 1.1.156; 1.2.177; 1.1.180; 1.1.181; 1.2.182; 1.1.212; 1.1.213; 1.2.216; 1.1.219; 2.1.259; 2.1.260; 2.1.261; 2.1.263; 2.2.264; 2.2.265; 2.2.266; 2.2.267; 2.2.268 .....31

**Figura 14:** Gel de agarose mostrando o resultado da amplificação. O poço 1 contém o marcador  $\lambda$  Hind III, indivíduos: 1.1.107; 1.1.136; 1.1.147; 1.1.155; 1.1.156; 1.2.177; 1.1.180; 1.1.181; 1.1.212; 1.1.213; 1.2.216; 1.1.219; 2.1.259; 2.1.260; 2.1.261; 2.1.263; 2.2.264; 2.2.265; 2.2.266; 2.2.267; 2.2.268 .....32

**Figura 15:** Alinhamento das seqüências feito pelo Programa Clustal/W, a partir do programa BioEdit .....32

**Figura 16:** Análise de agrupamento de todos os indivíduos seqüenciados. O método de agrupamento utilizado foi o das distâncias médias por UPGMA .....35

**Figura 17:** Análise de agrupamento dos indivíduos seqüenciados com exceção dos quatro indivíduos da Serra do Itapety com DNA discrepante. O método de agrupamento utilizado foi o das distâncias médias por UPGMA.....36

## LISTA DE ANEXOS

|   |    |
|---|----|
| <b>Anexo 1:</b> Protocolo de Extração de DNA .....  | 44 |
| <b>Anexo 2:</b> Protocolo para PCR .....            | 45 |
| <b>Anexo 3:</b> Protocolo para Sequenciamento ..... | 46 |
| <b>Anexo 4:</b> Sequências .....                    | 48 |

## SUMÁRIO

|                                       |    |
|---------------------------------------|----|
| INTRODUÇÃO.....                       | 15 |
| Marcadores Moleculares.....           | 16 |
| Anfíbios.....                         | 17 |
| Espécie estudada.....                 | 18 |
| OBJETIVO.....                         | 19 |
| MÉTODO.....                           | 20 |
| Área de estudo.....                   | 20 |
| Coleta e Manuseio dos Exemplares..... | 21 |
| Padrões morfológicos dorsais.....     | 22 |
| Extração do DNA e Amplificação.....   | 25 |
| Seqüenciamento e Alinhamento.....     | 25 |
| Análise dos Dados.....                | 25 |
| RESULTADOS E DISCUSSÕES.....          | 27 |
| Dados Ecológicos.....                 | 27 |
| Procedimentos de Laboratório.....     | 29 |
| Estruturação Genética.....            | 34 |
| CONCLUSÕES.....                       | 39 |
| REFERÊNCIAS.....                      | 40 |
| ANEXO I.....                          | 45 |
| ANEXO II.....                         | 46 |
| ANEXO III.....                        | 47 |
| ANEXO IV.....                         | 49 |

## INTRODUÇÃO

Quando a expressão diversidade biológica (ou biodiversidade) começou a ser difundida, trazia como base um conjunto de riqueza (número de espécies de uma comunidade e suas interações) e variabilidade genética (diversidade de alelos nos vários locos de uma espécie) (SOLÉ-CAVA, 2001). Devendo ser reconhecida como um recurso natural que tem que ser registrada, e principalmente preservada (WILSON, 1997). Segundo WILSON (1997), uma espécie para ter sucesso ecológico precisa ter várias populações geneticamente diversas para poder assegurar sua persistência diante das mudanças ambientais.

Com o aumento da população humana (WILSON, 1997) e a revolução industrial, tivemos grandes mudanças na biodiversidade (SOLÉ-CAVA, 2001; WONG ET AL, 2004), inclusive espécies que se extinguíram sem antes podermos conhecer seu número original (WILSON, 1997). Mesmo atualmente, nosso conhecimento com relação às espécies é ainda insatisfatório (WILSON, 1997; BENFORD, 1992; MEDEIROS, 2003; CULLEN JR. ET AL, 2003), ou seja, ainda estamos perdendo populações antes mesmo de conhecer sua diversidade genética.

A fragmentação é uma das maiores responsáveis pela perda de diversidade genética dos organismos (DAVIES ET AL, 2003), pois, com a supressão da vegetação, as populações presentes no local são extintas, podendo levar à extinção espécies endêmicas (WILSON, 1997). E as populações que persistem, na maioria das vezes, são separadas e isoladas impedindo seu fluxo gênico, deixando-as vulneráveis a extinção (WILSON, 1997).

Em conjunto com a ecologia e a biologia de populações, a genética da conservação é um instrumento importante na determinação de o que e como conservar a maior quantidade de diversidade genética nas populações, mantendo o potencial evolutivo de uma espécie ou população (PEREZ-SWEENEY ET AL, 2003). A biologia molecular nos disponibiliza métodos para detectar polimorfismos genético (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995) nos dando respaldo para analisar aspectos que não são reconhecidos morfológicamente, podendo até revelar espécies crípticas (CRAWFORD, 2003; CHEK, 1999).

Conhecer os níveis de fluxo gênico entre as populações em áreas fragmentadas é importante para determinar em que grau a fragmentação está impedindo a troca genética entre as populações (PEREZ-SWEENEY ET AL, 2003), fornecendo subsídios para a implantação de estratégias de manejo a fim de evitar a endogamia (SANTOS ET AL, 2002; PEREZ-SWEENEY ET AL, 2003). Além de que estudos genéticos podem revelar a extensão geográfica que uma espécie ocupa (SANTOS ET AL, 2002).

Estudos moleculares podem ser importantes para a detecção de áreas de endemismos, para a implantação de estratégias de manejo e conservação de espécies (PEREZ-SWEENEY ET AL, 2003), assim como para a criação de unidades de conservação (SANTOS ET AL, 2002). Métodos de remediação da perda genética, como por exemplo, clonagem e criopreservação são dispendiosos e de eficácia relativa (MEDEIROS, 2003), sendo mais rentável econômica e ecologicamente conservar a remediar.

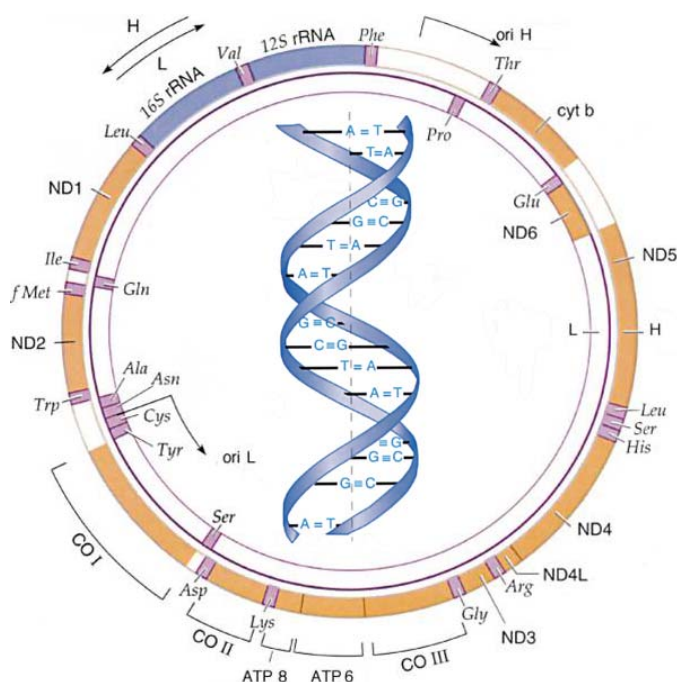
### MARCADORES MOLECULARES

Nos últimos anos os marcadores moleculares têm auxiliado a detecção da variabilidade genética das populações (TELLES ET AL, 2001), sendo que a escolha do marcador a ser estudado é muito importante para o bom andamento do projeto (PEREZ-SWEENEY ET AL, 2003). Para essa escolha deve-se levar em conta aspectos como o objetivo que se quer alcançar, seu custo e as condições laboratoriais disponíveis (PEREZ-SWEENEY ET AL, 2003). Por exemplo, para se estudar indivíduos, famílias e populações deve-se utilizar marcadores que evoluem rapidamente sendo que marcadores que evoluem mais lentamente devem ser utilizados no estudo de espécies ou táxons supra-específicos (SOLÉ-CAVA, 2001).

O genoma mitocondrial (DNAm) é muito utilizado para quantificar a diversidade inter e intra-populacional. Dois fatores determinam as vantagens do DNA mitocondrial sobre o DNA nuclear para estudos de variabilidade genética: (1) é transmitido apenas pela mãe fornecendo dados de dispersão e evolução dos organismos (AVISE, 1989; VIGILANT, 1989; PEREZ-SWEENEY ET AL, 2003); (2) possui baixa recombinação e rápida taxa evolutiva (AVISE, 1989; VIGILANT, 1989; PEREZ-SWEENEY ET AL, 2003) sendo que as seqüências não-codificadoras são mais variáveis que as regiões codificadoras (LOURENÇO ET AL, 2003).

Em geral, a conformação do DNAm é circular (GRAY, 1999 - Fig. 1) tendo tamanho aproximado de 16 – 20 kb (AVISE, 1989; ANANIAS, 2002) e possui 37 – 38 regiões codificadoras (AVISE, 1989). A região controle (não-codificadora) e o gene citocromo b (região codificadora de proteínas), ambas regiões do DNAm, são bastante utilizados para estudos populacionais e de sistemática (PEREZ-SWEENEY ET AL, 2003). Isso se deve principalmente, a baixa taxa de recombinação e rápida taxa evolutiva apresentada por ambos (PEREZ-SWEENEY ET AL, 2003).





**Figura 1:** Esquema gráfico mostrando a organização do DNA mitocondrial.

<http://ipvgen.unipv.it/docs/projects/pix/mtDNA.jpg>

## ANFÍBIOS

Assim como a escolha dos marcadores é importante, também é a escolha do modelo biológico a ser estudado. No presente estudo, escolhemos anfíbios, mais especificamente anuros, Classe que possui 33 famílias, 352 gêneros e 4.837 espécies descritas no mundo (FROST, 2004) com 776 espécies encontradas no Brasil (SBH, 2005). Dessas, 180 são conhecidas no Estado de São Paulo, sendo 17% endêmicas (HADDAD, 1996).

Apesar dos números, ainda estamos longe de conhecermos a real riqueza de espécies de anuros no País, somente na última década foram descritas cerca de 60 espécies, baseados em estudos de taxonomia, história natural e ecologia (HARTMANN, 2004). Provavelmente com os estudos moleculares esse número seja aumentado pela possibilidade de descobrimento de espécies crípticas dentro de espécies de ampla distribuição, como já tem sido observado (SOLÉ-CAVA, 2001).

Há poucos estudos de evolução com anfíbios, talvez por eles serem morfologicamente pouco variáveis. Por outro lado, algumas características em anfíbios variam bruscamente, como por exemplo, padrões morfológicos (CHEK, 1999; HOFFMAN & BLOUIN, 2000).

Estudos moleculares com anfíbios têm sido realizados principalmente para análises de relacionamento filogenético, sendo ainda escassos os estudos de variabilidade populacionais (ANANIAS, 2002). No Brasil ocorre o mesmo, os poucos estudos moleculares realizados têm-se concentrado em filogenia (BALDISSERA, 2000; LOURENÇO, ET AL, 2003; ANANIAS ET AL,

2002; FAIVOVICH ET AL, 2004; SILVA ET AL, 2004; FAIVOVICH ET AL, 2005) sendo conhecido apenas um trabalho baseado em estudos de filogeografia e variabilidade populacional envolvendo anuros (CARNAVAL, 2002).

### ESPÉCIE ESTUDADA

A espécie escolhida para o estudo pertence ao gênero *Eleutherodactylus* (Família Leptodactylidae), que se subdivide em quatro subgêneros (*Eleutherodactylus*, *Euhias*, *Pelorius* e *Syrhopus*) (SIQUEIRA-JR. et al, 2004). É endêmico dos neotrópicos (CRAWFORD, 2003), possuindo cerca de 700 espécies, sendo o gênero que possui o maior número de espécies entre os vertebrados (HÖBEL, 1999; SIQUEIRA-JR. ET AL, 2004, CRAWFORD & SMITH, 2005). Das 59 espécies presentes no Brasil (AMPHIBIA WEB, 2005; SBH, 2005), 22 espécies estão localizadas no sul e sudeste (SIQUEIRA-JR. ET AL, 2004). A escolha de uma espécie deste gênero foi influenciada pela grande presença de polimorfismos neste grupo. Das 225 espécies de anfíbios que possuem conhecidos polimorfismos fenotípicos, mais de um terço são pertencentes ao gênero *Eleutherodactylus* (HOFFMAN & BLOUIN, 2000).

Assim, foi escolhida a espécie *Eleutherodactylus parvus* que é uma espécie de solo, exclusivamente florestal (PEARMAN, 1997). O tamanho dos indivíduos de *E. parvus* variam de 12,9 à 22,0 mm, sendo as fêmeas de tamanho médio maior que os machos (19,7mm fêmeas – 14,0mm machos) (HEYER ET AL, 1990).

Os indivíduos de *E. parvus* apresentam polimorfismo cromático (HEYER ET AL, 1990; HOFFMAN & BLOUIN, 2000), com a seguinte variação cromática dorsal: creme, dourado, marrom, preto, ferrugem e laranja (HEYER ET AL, 1990). Em geral, apresentam um focinho de sub-ovóide à aproximadamente arredondado em vista dorsal e arredondado em vista de perfil (HEYER ET AL, 1990). Em relação à textura dorsal, possui uma textura lisa ou com pequenas verrugas espalhadas e pequenos tubérculos glandulares (HEYER ET AL, 1990).

Nas mãos, seu terceiro dedo é maior que os outros três, e todos possuem as pontas arredondadas e pontiagudas na extremidade, com a ponta do terceiro dedo sendo mais larga que os demais (HEYER ET AL, 1990). Nos pés, o quarto dedo é maior e a sua extremidade mais larga que nos demais (HEYER ET AL, 1990).

Escolhemos a espécie *E. parvus* por: (1) fazer parte de um gênero extenso e pouco explorado; (2) possuir dois padrões morfológicos distintos e claramente observáveis; (3) serem exclusivamente florestais, impedindo assim seu deslocamento em áreas fragmentadas; (4) são encontrados em quase o ano todo e (5) serem encontradas nas duas localidades propostas para o estudo.

## OBJETIVO GERAL

Analisar polimorfismos genéticos em duas populações de *Eleutherodactylus parvus* (ANURA: LEPTODACTYLIDAE) localizadas em formações geográficas distintas (Serra do Mar e Serra do Itapety), com vistas à preservação e manejo de espécies em ambientes naturais.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o potencial da seqüência do gene citocromo b na identificação de polimorfismos genéticos populacionais em *E. parvus*, em relação aos dois padrões fenotípicos observados para a espécie e às populações amostradas em áreas geográficas distintas (Serra do Mar e Serra do Itapety).
2. Verificar se os indivíduos de *E. parvus* podem representar um caso de espécie críptica (biodiversidade nominal), revelando-se duas espécies diferentes, conforme os padrões fenotípicos observados.
3. Inferir o grau de divergência genética entre as duas populações de *E. parvus* amostradas.

## MÉTODO

### 1. ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi realizado em duas Unidades de Conservação serranas de Mata Atlântica situadas no Estado de São Paulo, O Parque Natural Municipal da Serra Francisco Afonso de Melo – Chiquinho Veríssimo e a RPPN Parque das Neblinas. Além da facilidade de acesso essas localidades foram escolhidas por compreenderem complexos serranos distintos e por estarem isoladas pela bacia hidrográfica do Rio Tietê, que pode servir como uma barreira para espécies de anfíbios de serapilheira.

#### Parque Natural Municipal da Serra Francisco Afonso de Melo – Chiquinho Veríssimo

Situado em uma área de encosta, esse Parque, também conhecido como Parque Natural Municipal da Serra do Itapety (PNMSI) localiza – se na região centro-sul da Serra do Itapety (23° 28'S 46° 09'W), e, entre as altitudes de 807 metros a 1141 metros, ocupa 352,3 hectares no Município de Mogi das Cruzes, Estado de São Paulo (MANNA DE DEUS ET AL, 1995). É um conjunto serrano situado na borda do Planalto Paulistano e geomorfologicamente faz parte do complexo da Serra da Mantiqueira (TOMASULO & CORDEIRO, 2000).

Até o século XIX, antes de se tornar Parque, essa área foi bastante explorada visto a sua proximidade com a área urbana e devido à presença de mananciais em sua área. O Parque era utilizado para abastecer a cidade (MANNA DE DEUS ET AL, 1995).

#### RPPN Parque das Neblinas

O Parque das Neblinas situa-se no Município de Bertioga, Estado de São Paulo, divisa com o Distrito de Taiapuêba em Mogi da Cruzes, à 110km do centro da cidade de São Paulo. Devido à ação antrópica nos últimos 40 anos, o Parque possui uma cobertura florestal heterogênea, composta por plantios de eucalipto e Mata Atlântica Ombrófila Densa em diferentes estágios de sucessão ambiental. A região situa-se nos domínios da Serra do Mar e a topografia do parque é acidentada, com altitudes variando entre 700 e 1.154 m.

## 2. COLETA E MANUSEIO DOS EXEMPLARES

Foram coletados manualmente durante o dia e a noite 46 indivíduos de *E. parvus* (28 indivíduos do Parque das Neblinas e 18 indivíduos da Serra do Itapety). Desses, 28 indivíduos apresentaram o padrão I (18 do Parque das Neblinas e 10 da Serra do Itapety) e 16 indivíduos apresentaram o padrão II (8 indivíduos de cada localidade - Tabela 1).

**Tabela 1:** Resultados das coletas de anfíbios, mostrando o número total de *E. parvus* coletados e o número de indivíduos que foram obtidos material para a extração de DNA (Fígado e/ou músculo da coxa).

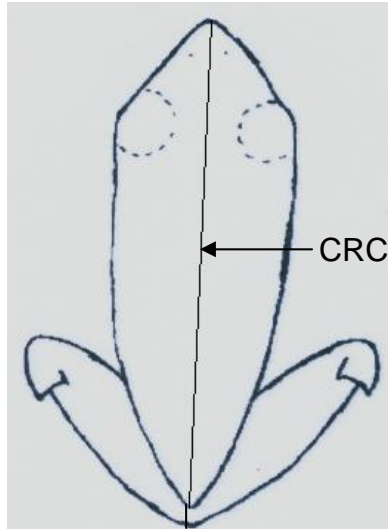
|                         | Neblinas |              | Itapety |              |
|-------------------------|----------|--------------|---------|--------------|
|                         | Total    | com material | Total   | com material |
| Indivíduos              | 30       | 26           | 18      | 17           |
| Machos                  | 9        | 8            | 2       | 2            |
| Fêmeas                  | 15       | 12           | 16      | 15           |
| Sexo não identificado   | 6        | 6            | 0       | 0            |
| Padrão I                | 21       | 19           | 10      | 9            |
| Padrão II               | 8        | 6            | 8       | 8            |
| Padrão não identificado | 1        | 1            | 0       | 0            |
| % Pad I                 | 70       | 73           | 55,56   | 52,94        |
| % Pad II                | 26,7     | 23           | 44,44   | 47,06        |

Os tecidos para extração do DNA foram obtidos de fígado e musculatura da coxa, sendo alicotado em pequenos pedaços e preservados em álcool etílico P.A. (CARNAVAL, 2002; ANANIAS, 2002).

Após a extração de tecido os animais foram fixados em solução de formol (10%) e serão depositados na coleção de anfíbios anuros do Museu de Zoologia da USP (MZUSP).

Os indivíduos foram classificados e separados de acordo com a sua localidade e padrão cromático. Sendo que os indivíduos coletados no Parque das Neblinas receberam o número 1 e os indivíduos coletados no Parque do Itapety receberam o número 2. O mesmo foi feito com padrões e depois seus números na coleção. Ex.: Indivíduo coletado na Serra do Itapety, de padrão 1 de número 261 na coleção – 2.1.261.

Após sua fixação, foi feita a identificação do sexo e foi tirada a medida do comprimento rostro – cloacal (CRC – Fig. 2) de 20 indivíduos do Parque das Neblinas e 18 indivíduos da Serra do Itapety, com um paquímetro digital. Essas medidas foram comparadas usando três variáveis independentes: Local, Sexo e Padrão.



**Figura 2:** Medida do Comprimento Rostro – Cloacal (CRC) feita em todos os indivíduos de *E. parvus* amostrados.

### 3. PADRÕES MORFOLÓGICOS DORSAIS

Apesar do alto grau de polimorfismo da espécie (HEYER ET AL, 1990), pudemos encontrar dois padrões morfológicos dorsais principais nos indivíduos de *E. parvus*:

- Padrão I: Dorso sem linhas dorso-lateral nem linhas dorso-mediana, podendo ter manchas pretas postero-laterais. (Fig. 3 e 4).
- Padrão II: Linhas dorso-lateral, que vai desde o focinho até o meio do dorso, e dorso-mediana presentes, de cor variando de branca a creme, sem manchas postero-laterais (Fig. 5 e 6).



**Figura 3:** *Eleutherodactylus parvus* exemplificando o padrão dorsal I.



**Figura 4:** *Eleutherodactylus parvus* exemplificando o padrão dorsal I.





**Figura 5:** *Eleutherodactylus parvus* exemplificando o padrão II.



**Figura 6:** *Eleutherodactylus parvus* exemplificando o padrão II.



#### 4. EXTRAÇÃO DO DNA E AMPLIFICAÇÃO

Depois de vários testes de extração com protocolos amplamente utilizados (fenol/clorofórmio, TNES, etc.) optamos por utilizar o que melhor se adequou aos experimentos (Anexo 1).

A região do DNAm<sub>t</sub> escolhida para amplificação foi o gene citocromo b. As amplificações foram realizadas via PCR em termociclador MJ PTC 100, com a utilização dos primers MVZ36/ MVZ55 para citocromo b (SILVA ET AL, 2004). Os volumes de reação e os ciclos de amplificação seguem o apresentado em Anexo (2).

Fizemos um gradiente de temperatura com o par de primers que amplificam o citocromo b (MVZ36/ MVZ55) onde cada poço do termociclador correspondia a diferentes temperaturas de anelamento. As temperaturas de anelamento que obtiveram melhor resultado foram: 56,9°C, 58,2°C, 60,0°C.

Utilizamos os resultados da amplificação com a temperatura de anelamento 58,2°C para o seqüenciamento.

#### 5. SEQÜENCIAMENTO E ALINHAMENTO

Os produtos de PCR foram precipitados (Anexo 3) e novamente corridos em gel de agarose, apenas os indivíduos de *E. parvus* que obtiveram bandas em destaque foram utilizados para o seqüenciamento. Segue protocolo em Anexo (3).

Após a edição das seqüências, elas foram alinhadas utilizando-se o programa CLUSTAL W (THOMPSON ET AL, 1994) por meio do programa BioEdit (HALL, 1999).

Um total de 20 indivíduos de *E. parvus* foram seqüenciados, 10 eram pertencentes ao Parque das Neblinas, e 10 eram pertencentes a Serra do Itapety sendo 5 representantes do Padrão I e 5 do Padrão II de cada localidade.

#### 6. ANÁLISE DOS DADOS

Em relação aos dados ecológicos, para testar o efeito do local, sexo e padrão dorsal sobre o comprimento rostro-cloacal de *E. parvus* foi realizado um teste de análise de variâncias (ANOVA) com três fatores (ZAR, 1999).

Para testar a estrutura genética populacional entre os indivíduos de diferentes localidades e padrões morfológicos foi utilizada a análise da variância molecular (AMOVA),

(EXCOFFIER ET AL, 1992). Para esse teste foi criado então um protocolo que continha os dois grupos de indivíduos divididos cada um em dois padrões. O grupo 1 continha apenas indivíduos do Parque das Neblinas enquanto o grupo 2 era composto de indivíduos da Serra do Itapety. Cada grupo foi subdividido de acordo com seu padrão cromático (padrão 1 e padrão 2). Assim esse projeto gerou três índices de fixação: um entre grupos, outro entre padrões dentro dos grupos e outro dentro dos padrões. Essas análises foram feitas por meio do programa Arlequin ver. 2.0 (SCHENEIDER ET AL, 2000).

Foi feita uma análise de agrupamento utilizando o teste de Kimura 2 parâmetros (KIMURA, 1980) como método de similaridade genética par a par. A partir da matriz de similaridade de Kimura foi gerado um dendrograma através do método de UPGMA. Foram obtidos também os valores de Bootstrap (medida de apoio estatístico) para a construção do dendrograma. Essa análise foi feita pelo software MEGA 3.1 (KUMAR ET AL, 2004).

Devido a presença de quatro indivíduos da Serra do Itapety muito diferenciados (suas seqüências são muito diferentes das demais, sugerindo uma contaminação das amostras), todas as análises estatísticas e o dendrograma descritos acima foram rodadas duas vezes: uma incluindo e outra excluindo esses quatro indivíduos.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 1 - DADOS ECOLÓGICOS

Os indivíduos de *E. parvus* puderam ser encontrados ao longo do ano, independentemente da estação chuvosa. O que indica que essa espécie não possui reprodução explosiva. Mesmo assim, pudemos observar os indivíduos vocalizando principalmente depois e/ou durante as chuvas em maior quantidade. O horário em que mais pôde-se encontrá-los foi de 17:00 às 19:00 (período crepuscular).

Segundo HEYER (1990), em Boracéia, essa espécie não pôde ser observada em atividade reprodutiva durante o mês de junho. *Eleutherodactylus* spp. são espécies de desenvolvimento direto, ou seja, possuem uma eclosão direta do ovo sem passar pela forma de girino (LUTZ, 1944; CRAWFORD & SMITH, 2005) não dependendo de corpos d'água para se desenvolver (PAULO C. A. GARCIA, com. pess.) o que lhe propicia a atividade durante o ano todo (BERTOLUCI & RODRIGUES, 2002).

Seu local de vocalização é na serapilheira (Fig. 7), tornando difícil a sua localização. As fêmeas se deslocam mais do que os machos (obs. pess.), isso somado ao fato de que elas foram encontradas, geralmente, sobre a serapilheira (próxima a um macho vocalizando) nos possibilitou coletar mais fêmeas do que machos.



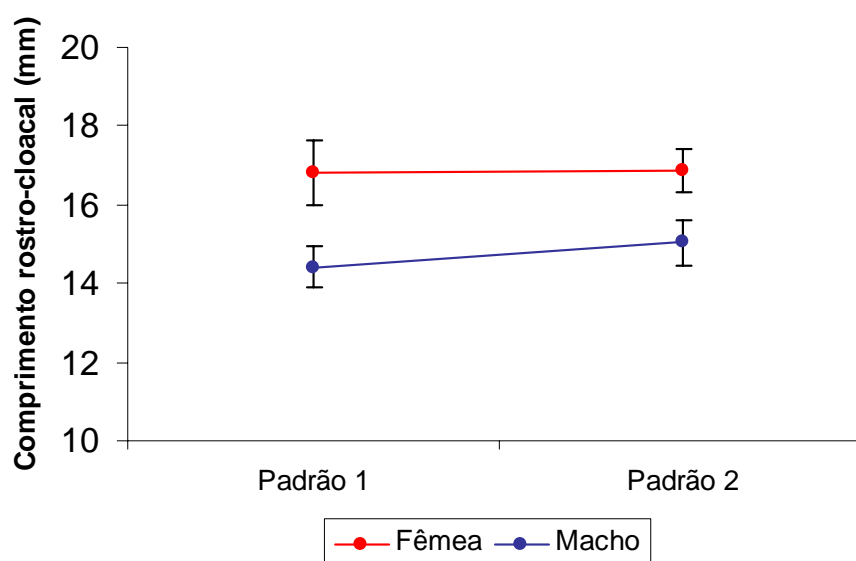
**Figura 7:** *Eleutherodactylus parvus*. Exemplo do seu sítio de vocalização.

Não foram encontrados efeitos significativos do local de coleta e do padrão dorsal sobre o tamanho dos indivíduos (comprimento rostro-cloacal) de *E. parvus* (Tabela 2). Por outro lado, houve efeito significativo do sexo sobre o tamanho (Tabela 2), sendo que as fêmeas de *E. parvus* foram significativamente maiores do que os machos independentemente do seu padrão dorsal (Fig. 8) e do local em que foram encontradas (Fig. 9). Essa diferença corrobora os resultados anteriormente encontrados por HEYER (1990), onde o tamanho médio dos machos chegou a 14,0 mm e das fêmeas 19,7 mm.

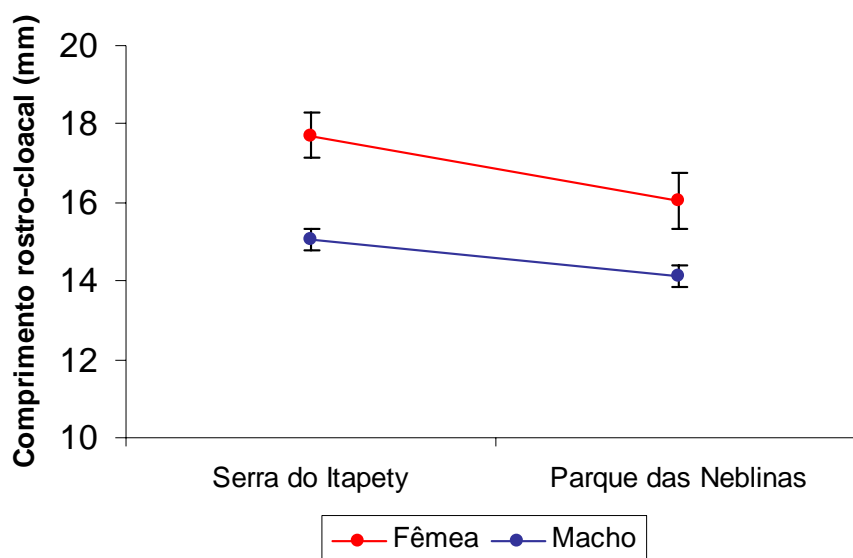
**Tabela II.** ANOVA de três fatores comparando o comprimento rostro-cloacal de *E. parvus* entre a Serra do Itapety e a Serra das Neblinas (Local), macho e fêmea (Sexo) e padrões dorsais (Padrão).

| Variáveis independentes | Soma de quadrados | Desvio padrão | Quadrado médio | F     | p                  |
|-------------------------|-------------------|---------------|----------------|-------|--------------------|
| LOCAL                   | 8,357             | 1             | 8,357          | 1,492 | 0,231              |
| SEXO                    | 24,793            | 1             | 24,793         | 4,427 | 0,044 <sup>a</sup> |
| PADRÃO                  | 3,083             | 1             | 3,083          | 0,550 | 0,464              |
| LOCAL x SEXO            | 0,769             | 1             | 0,769          | 0,137 | 0,714              |
| LOCAL x PADRÃO          | 6,826             | 1             | 6,826          | 1,219 | 0,278              |
| SEXO x PADRÃO           | 14,043            | 1             | 14,043         | 2,508 | 0,124              |
| LOCAL x SEXO x PADRÃO   | 9,131             | 1             | 9,131          | 1,631 | 0,211              |

<sup>a</sup>: Valor de p significativo.



**Figura 8:** Média e erro padrão do comprimento rostro-cloacal de fêmeas e machos de *E. parvus* dos padrões dorsais 1 e 2.

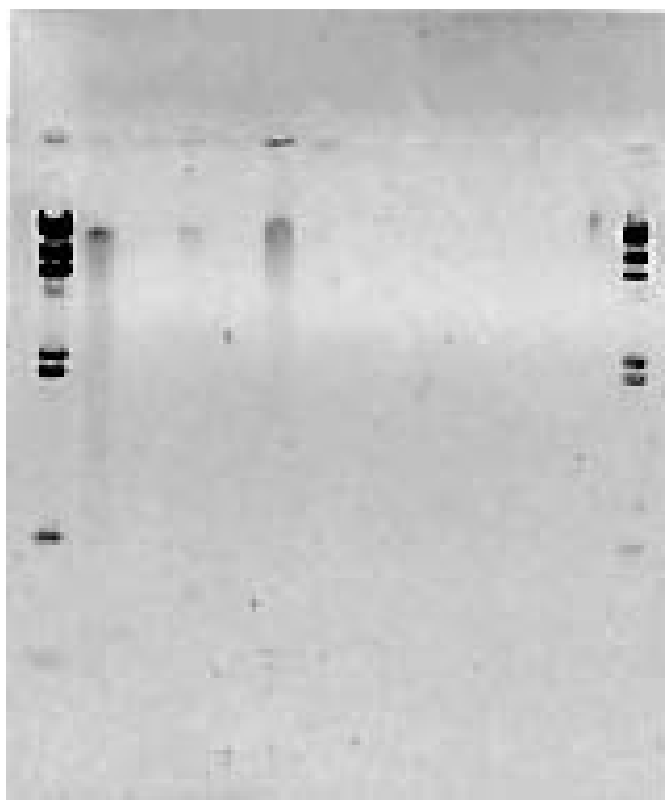


**Figura 9:** Média e erro padrão do comprimento rostro-cloacal de fêmeas e machos de *E. parvus* coletados na Serra do Itapety e no Parque das Neblinas.

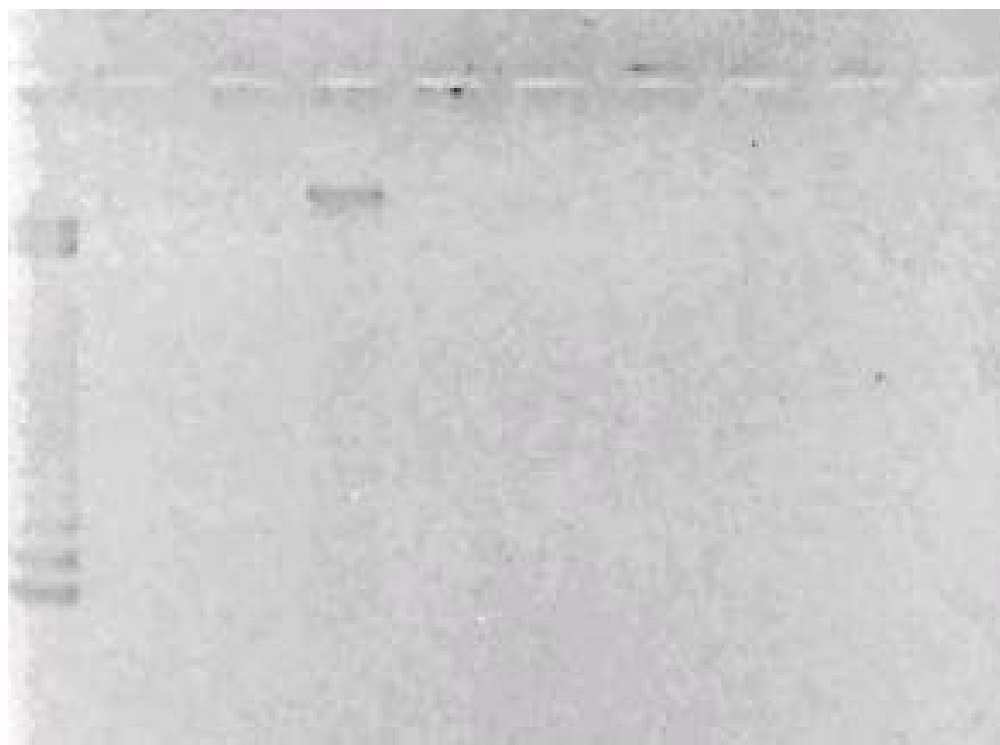
## 2 - PROCEDIMENTOS DE LABORATÓRIO

### 1. Extração de DNA

Foram feitas várias tentativas de protocolos até encontrar o mais adequado (vide Anexo 1) para a extração de DNA. Mesmo assim, ao fazer o gel de agarose, o resultado foi insatisfatório, pois, na maioria das vezes, não apareceram bandas no gel de agarose (Fig. 10, A e B).



A



B

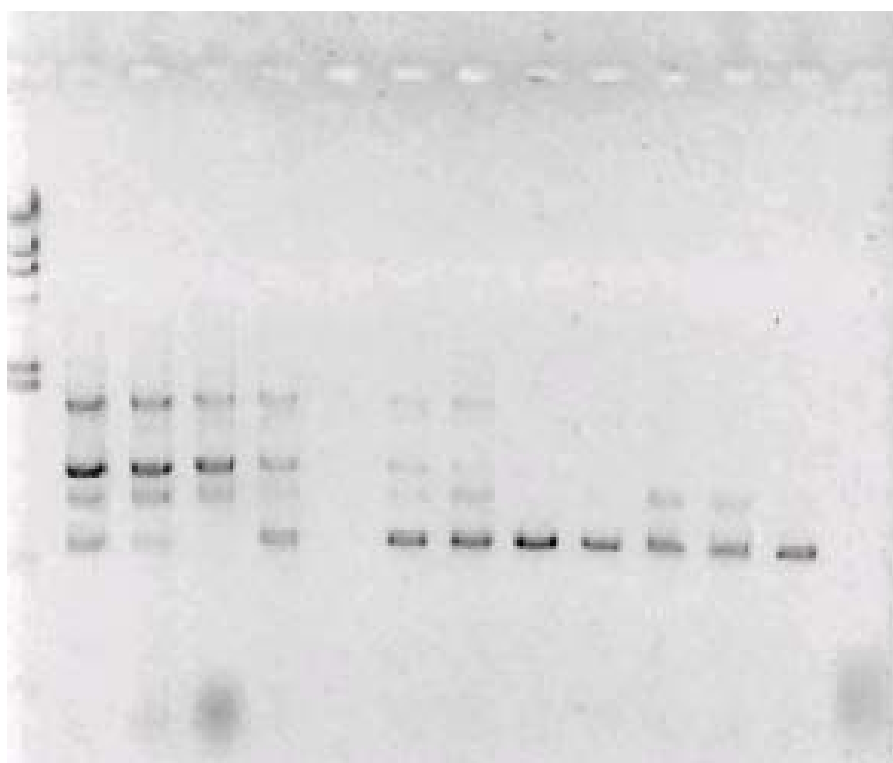
**Figura 10:** Gel de agarose, representando extração de DNA. Nessa ordem aparecem nos pocinhos: (A) Marcador  $\lambda$  Hind III; indivíduos: 1.1.107; 1.1.136; 1.1.146; 1.1.147; 1.1.155; 1.1.156; 1.2.177; 1.2.178; 1.1.180; 1.1.181; 1.1.182; 1.1.212; Marcador Ladder 123. (B) Marcador Ladder 123; indivíduos: 1.1.107; 1.1.136; 1.1.146; 1.1.147; 1.1.155; 1.1.156.

## 2. Amplificação

Primeiramente foi feito um teste amplificando as amostras extraídas com o primer que amplifica a região 16S do DNAm. Ao correr o gel de agarose, as amostras foram amplificadas, comprovando a existência de DNA.

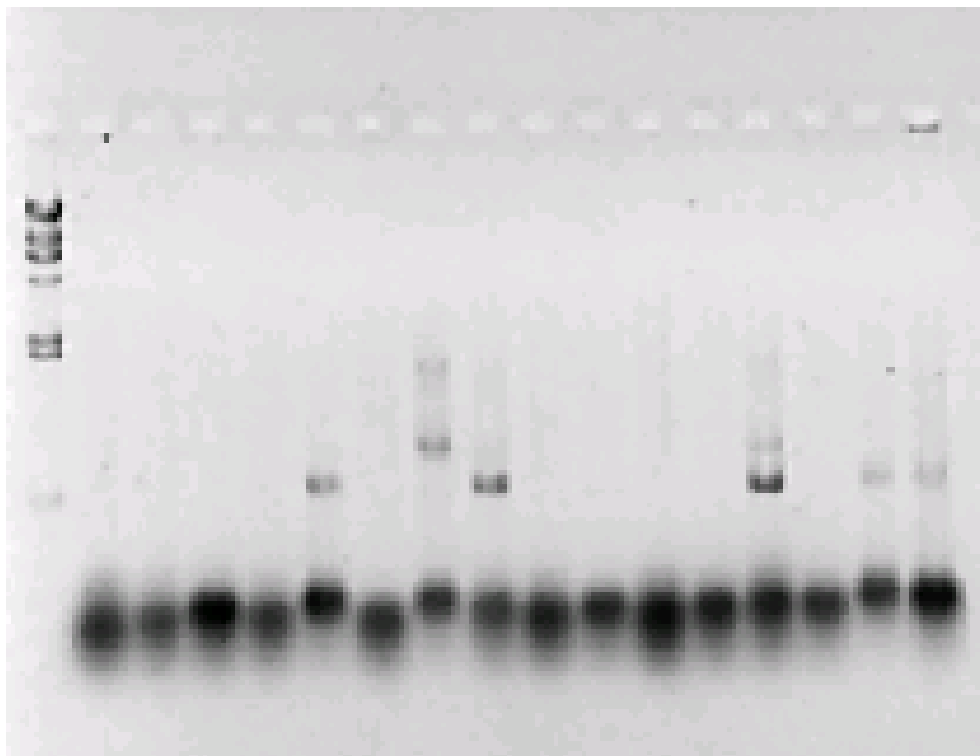
O primer do gene 16S foi escolhido, por esse gene ser bastante conservado, então a possibilidade do primer amplificar o DNA é grande. Justamente por causa disso, os genes 12S e 16S são usados para examinar as relações filogenéticas entre taxas superiores como gêneros e famílias (SUMIDA ET AL, 1998).

Após a certificação da extração do DNA foi feito o gradiente de temperatura (Fig. 11) utilizando os primers que amplificam o gene citocromo b (MVZ36/ MVZ55), onde as temperaturas de anelamento que permitiram uma melhor amplificação foram: 56,9°C; 58,2°C e 60,0°C.

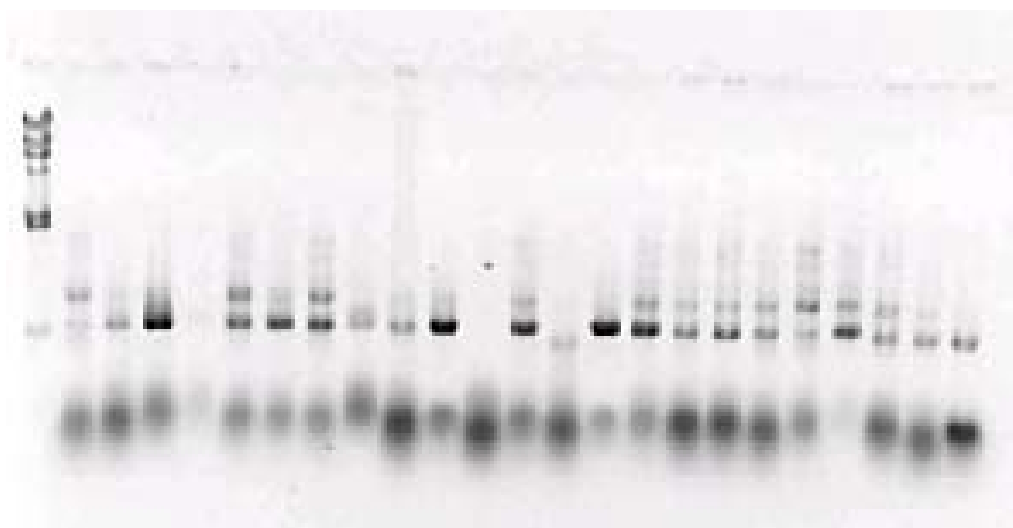


**Figura 11:** Gel de agarose mostrando o resultado do gradiente de temperatura dos primers MVZ36 e MVZ55. O primeiro poço contém o marcador  $\lambda$  Hind III, o último poço foi o controle e os demais poços seguem com as seguintes temperaturas respectivamente: 48,0°C; 48,3°C; 48,9°C; 50,0°C; 51,4°C; 53,1°C; 55,2°C; 56,9°C; 58,2°C; 59,1°C; 59,8°C; 60,0°C.

Fizemos então a amplificação de acordo com o gradiente de temperatura (temperatura de anelamento 56,9°C – Fig. 12) (temperatura de anelamento 58,2°C – Fig. 13) (temperatura de anelamento 60,0°C – Fig. 14).



**Figura 12:** Gel de agarose mostrando o resultado da amplificação. O poço 1 contém o marcador  $\lambda$  Hind III, indivíduos: 1.1.107; 1.1.136; 1.1.147; 1.1.155; 1.1.156; 1.2.177; 1.2.216; 2.1.259; 2.1.260; 2.1.261; 2.1.263; 2.2.264; 2.2.265; 2.2.266; 2.2.267; 2.2.268.



**Figura 13:** Gel de agarose mostrando o resultado da amplificação. O poço 1 contém o marcador  $\lambda$  Hind III, indivíduos: 1.1.107; 1.1.136; 1.1.146; 1.1.147; 1.1.155; 1.1.156; 1.2.177; 1.1.180; 1.1.181; 1.2.182; 1.1.212; 1.1.213; 1.2.216; 1.1.219; 2.1.259; 2.1.260; 2.1.261; 2.1.263; 2.2.264; 2.2.265; 2.2.266; 2.2.267; 2.2.268.





### 3 - ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA

Em relação à diferença genética entre as populações do Parque das Neblinas e da Serra do Itapety, ambas as análises de AMOVA (com e sem os indivíduos de DNA discrepante), demonstraram que as duas populações encontram-se altamente estruturadas geneticamente (Altos valores de  $F_{st}$  - Tabelas 3 e 4). Essa estruturação foi gerada pela alta taxa de variação genética encontrada entre as populações sendo que 47% (com indivíduos de DNA discrepantes - Tabela 3) e 77% (sem indivíduos de DNA discrepantes - Tabela 4) da variação genética total das populações é atribuído as diferenças da frequência alélica entre as localidades.

Por outro lado, foi encontrado um baixo índice de fixação ( $F_{sc}$ ) e uma baixa porcentagem de variação entre os indivíduos que possuíam os diferentes padrões morfológicos dentro da mesma localidade (Tabelas 3 e 4).

**Tabela 3.** AMOVA (Análise de variância Molecular) entre padrões morfológicos e populações utilizando todos os indivíduos seqüenciados.

| Fonte de variação              | Graus de Liberdade | Soma de Quadrados | Componentes de Variância | Porcentagem de Variação |
|--------------------------------|--------------------|-------------------|--------------------------|-------------------------|
| Entre Grupos                   | 1                  | 74,65             | 6,54 Va                  | 46,78                   |
| Entre Padrões dentro de Grupos | 2                  | 18,5              | 0,45 Vb                  | 3,24                    |
| Dentro dos Padrões             | 16                 | 111,8             | 6,99 Vc                  | 49,98                   |
| Total                          | 19                 | 204,95            | 13,98                    |                         |

Índices de Fixação:

$F_{sc}$ : 0,06

$F_{st}$ : 0,50

$F_{ct}$ : 0,46

Teste de Significância (1023 permutações):

Vc e  $F_{st}$ :  $P = 0,00293 \pm 0,00164$

Vb e  $F_{sc}$ :  $P = 0,27273 \pm 0,01362$

Va e  $F_{ct}$ :  $P = 0,32551 \pm 0,00000$

**Tabela 4.** AMOVA (Análise de variância Molecular) entre padrões morfológicos e populações sem a utilização dos 4 indivíduos com DNA discrepante.

| Fonte de variação              | Graus de Liberdade | Soma de Quadrados | Componentes de Variância | Porcentagem de Variação |
|--------------------------------|--------------------|-------------------|--------------------------|-------------------------|
| Entre Grupos                   | 1                  | 40,28             | 5,15 Va                  | 77,16                   |
| Entre Padrões dentro de Grupos | 2                  | 3,36              | 0,06 Vb                  | 0,85                    |
| Dentro dos Padrões             | 12                 | 17,6              | 1,47 Vc                  | 21,99                   |
| Total                          | 15                 | 61,24             | 6,68                     |                         |

|                            |   |
|----------------------------|---|
| <u>Índices de Fixação:</u> | <u>Teste de Significância (1023 permutações):</u> |
| Fsc: 0,04                  | Vc e Fst: P< 0,00001 +- 0,00000                   |
| Fst: 0,78                  | Vb e Fsc: P= 0,46921 +- 0,01390                   |
| Fct: 0,77                  | Va e Fct: P= 0,33920 +- 0,01373                   |

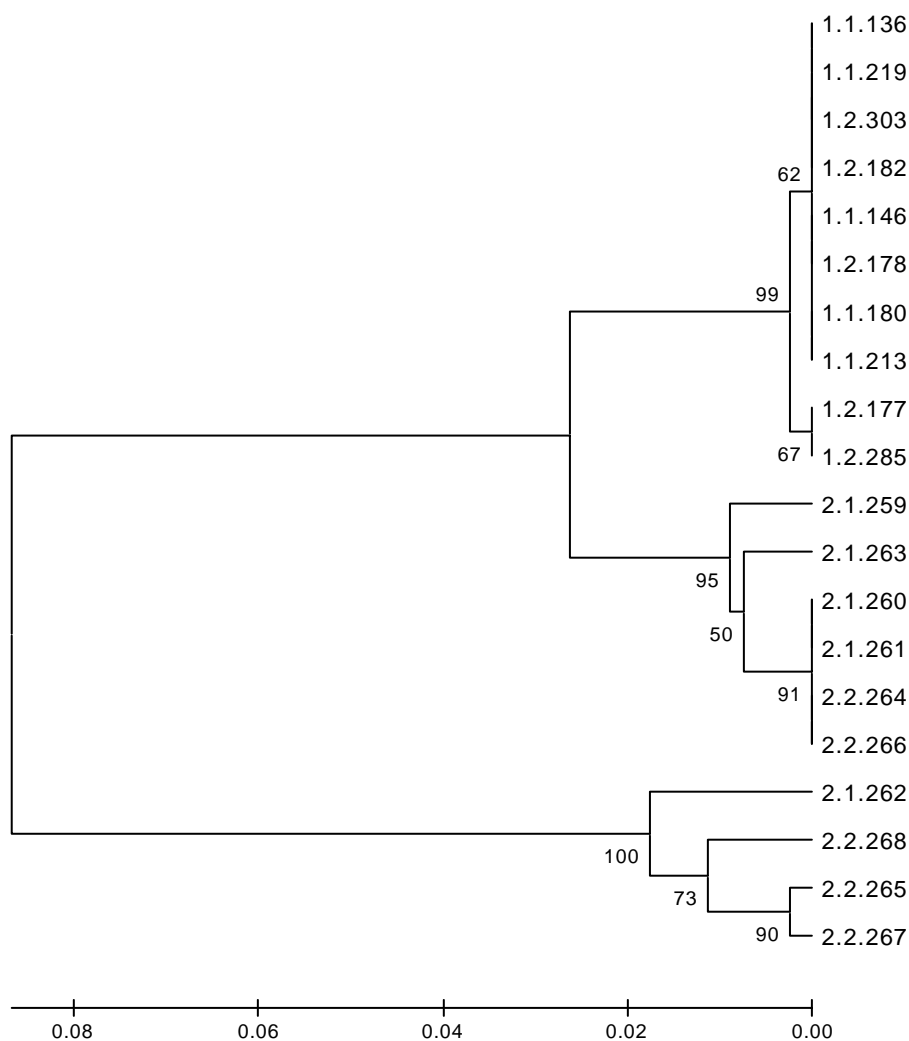
A alta taxa de estruturação genética entre localidades demonstra que provavelmente não exista fluxo gênico entre essas populações. De fato, o índice de fluxo gênico encontrado ( $N_m = 0,53$ ) é considerado baixo (PATTON ET AL, 1996), reafirmando a ausência de troca genética. As duas localidades em estudo são dois fragmentos florestais que estão isoladas entre si pela Bacia Hidrográfica do Rio Tietê, que provavelmente se tornou uma barreira à dispersão de *E. parvus*. Isso pode ter ocorrido devido ao fato de que *E. parvus*, ser uma espécie dependente de ambientes florestais (sempre encontradas em meio a serrapilheira, CRAWFORD, 2003; GIARETTA ET AL, 1997) que sofrem influência das bordas dos fragmentos (SCHLAPFER & GAVIN, 2001; PEARMAN, 1997), sendo que os indivíduos desta espécie podem ter sido isolados por um ambiente não florestal formada pelo surgimento da bacia do Rio Tietê. Desse modo houve uma interrupção do fluxo gênico entre essas populações, fazendo com que elas se estruturassem geneticamente ao longo do tempo. A alta variabilidade genética entre os *E. parvus* presentes nas duas localidades (Tabela 4) indica que esse evento ocorreu a um longo tempo.

Em um trabalho realizado também com espécies florestais de anfíbios (*Proceratophrys boiei*, *Hyla albomarginata* e *Scinax nebulosus*) foi encontrado um baixo índice de fluxo gênico entre populações (CARNAVAL, 2002). Por outro lado, neste mesmo trabalho, foi encontrado um alto índice de fluxo gênico em uma espécie generalista de anfíbio (*Hyla*

*branneri*) sugerindo que a barreira entre populações para uma determinada espécie não ocorre necessariamente para outra espécie em simpatria (CARNAVAL, 2002; PATTON ET AL, 1996).

Em relação a divergência genética entre indivíduos com diferentes padrões morfológicos o baixo índice de fixação ( $F_{sc}$ ) indica que existe uma baixa variação genética entre esses indivíduos sendo que provavelmente a diferença morfológica do padrão de manchas indique apenas polimorfismos pertencentes a uma mesma espécie. Esse polimorfismo cromático foi observado em trabalhos anteriores com espécies de *Eleutherodactylus* (GOIN, 1950; HEYER, 1984). Para esse gênero, a presença de vários padrões morfológicos dentro da mesma espécie parece ocorrer em várias espécies (GOIN, 1950).

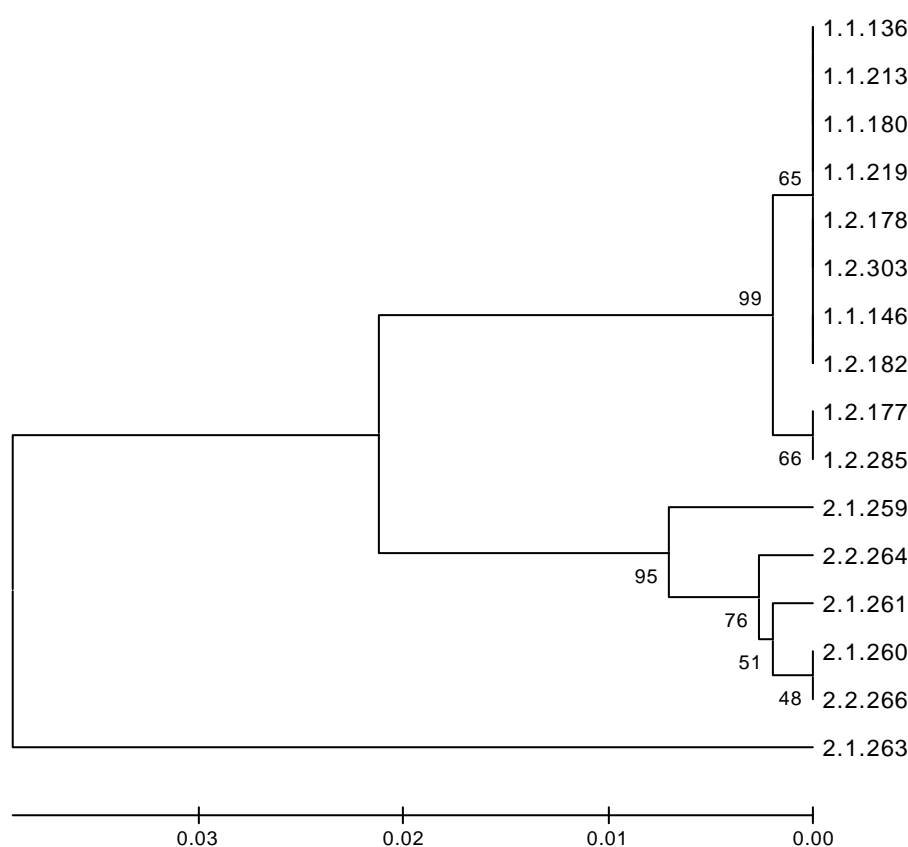
A análise de agrupamento, que incluiu todos os 20 indivíduos analisados, demonstrou a formação de dois grupos principais. Um deles composto por todos os indivíduos do Parque das Neblinas e 6 indivíduos da Serra do Itapety e o outro formado apenas por 4 indivíduos da Serra do Itapety com uma grande distância genética (Figura 16).



**Figura 16:** Análise de agrupamento de todos os indivíduos seqüenciados. O método de agrupamento utilizado foi o das distâncias médias por UPGMA.

Mesmo assim, em concordância com os dados da AMOVA, é possível diferenciar dois grupos mais internos que evidenciam a existência de separação genética entre as localidades e a ausência de segregação gênica entre os padrões morfológicos (Figura 16).

Uma segunda análise de agrupamento que exclui os 4 indivíduos com DNA discrepante, também demonstra uma clara separação entre indivíduos de diferentes localidades (Figura 17).



**Figura 17:** Análise de agrupamento dos indivíduos sequenciados com exceção dos quatro indivíduos da Serra do Itapety com DNA discrepante. O método de agrupamento utilizado foi o das distâncias médias por UPGMA.

Podemos observar também, que a figura (17) evidencia mais um indivíduo da Serra do Itapety com uma divergência genética maior, porém não tão grande quanto a dos outros quatro indivíduos incluídos na análise anterior (Figura 16). De fato, a diversidade genética dos *E. parvus* do Itapety, (2,2%, excluindo-se os quatro indivíduos de DNA discrepante) se mostra bem maior do que os do Parque das Neblinas (0,4%).

SECCHI ET AL (1998), ao analisarem a diversidade genética de golfinhos brasileiros (*Pontoporia blainvillei*) divididos em população Norte e Sul (Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul respectivamente), puderam notar que os golfinhos do Rio de Janeiro obtiveram uma

menor diversidade genética de que os Golfinhos do Rio Grande do Sul, talvez pelo fato de a população Norte é menor em tamanho do que, a população Sul ou ainda, pode estar em processo de declínio. Para o presente trabalho, a metodologia aplicada não nos permitiu inferir o tamanho das populações estudadas. Apesar disso, esse pode ser um importante fator influenciador da diferença na variabilidade genética entre as populações. Estudos indicam que populações pequenas, reduzidas principalmente devido a fragmentação de habitats, possuem uma diminuição na sua variabilidade genética (KAGEYAMA ET AL, 1998). Essa redução parece ser causada a curto prazo, por deriva genética, o que significa ter as frequências de seus genes afastadas daquelas da população original, inclusive chegando a perder alelos. A mais longo prazo, ainda pode haver um aumento da endogamia, decorrente da maior probabilidade de autofecundação e acasalamento entre indivíduos aparentados (KAGEYAMA ET AL, 1998).

## CONCLUSÕES

1. A técnica de seqüenciamento do gene citocromo b foi eficiente na identificação de duas populações de *E. parvus* isoladas entre si em duas reservas de Mata Atlântica (Parque das Neblinas e Serra do Itapety).
2. A presença de dois padrões morfológicos distintos em *E. parvus* parece não indicar um caso de espécie críptica, no entanto, utilizamos como parâmetro apenas a coloração dorsal de *E. parvus* sendo que podem existir diferenças significativas em relação à outras características como por exemplo, vocalização.
3. Por fim, as duas populações de *E. parvus* se apresentaram geneticamente distintas, indicando uma possível ausência de fluxo gênico entre as duas localidades.

## REFERÊNCIAS

- AmphibiaWeb: Information on amphibian biology and conservation. [web application]. 2005. Berkeley, California: AmphibiaWeb. Available: <http://amphibiaweb.org/>.
- Ananias, F. Análise citogenética e do DNA mitocondrial de populações de *Hyla semiguttata* (Anura, Hylidae) e espécies relacionadas. (Doutorado). Instituto de Biologia, UniCamp, Campinas, 2002. 123 p.
- Ananias, F, P. C. A. Garcia, S.M. Recco-Pimentel. Conserved karyotypes in the *Hyla pulchella* species group (Anura, Hylidae). Hereditas. V.140 n.1 p. 42-48 FEB 2004
- Avise, J. C. Gene trees and organismal histories: A phylogenetic approach to population biology. Evolution, v.43, n.6, p.1192-1208. 1989.
- Baldissera JR., F. A. Taxonomia e Filogenia do Grupo de *Bufo crucifer* Wied-Neuwied, 1821 (Anura, Bufonidae). (Tese de Doutorado). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2001. 178 p.
- Benford, G. Saving the library of life. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. v.89, n.22, p.11098- 11101. NOV. 1992.
- Bertoluci, J, M.T. Rodrigues. Seasonal patterns of breeding activity of Atlantic Rainforest anurans at Boraceia, Southeastern Brazil. Amphibia-Reptilia v.23, n.2, p. 161-167. 2002.
- Carnaval, A. C. O. Q. Phylogeography of four frog species in forest fragments of Northeastern Brazil - A preliminary study. Integrative and Comparative Biology, v.42, n.5, NOV, p.913-921. 2002.
- Chek, A. On Species and Speciation: what are appearances worth? (Doutorado). University of Guelph. 1999. 246 p.
- Crawford, A. J. e E. N. Smith. Cenozoic biogeography and evolution in direct-developing frogs of Central America (Leptodactylidae: *Eleutherodactylus*) as inferred from a phylogenetic analysis of nuclear and mitochondrial genes. Molecular Phylogenetics and Evolution, v.35, p.536-555. 2005.
- Crawford, A. J. Huge populations and old species of Costa Rica and Panamanian dirt frogs inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences. Molecular Ecology, n. 12, p. 2525-2540. 2003.
- Cullen Jr, L., R. Rudran, *et al.* Métodos de Estudos em Biologia da Conservação e Manejo da Vida Silvestre. Curitiba: Editora da Universidade Federal do Paraná. 2003. 667 p.



- Davies, R. G., L. M. Hernandez, *et al.* Environmental and spatial influences upon species composition of a termite assemblage across neotropical forest islands. Journal of Tropical Ecology. v. 19. p. 509-524. 2003.
- Excoffier L., P. E. Smouse, J. M. Quattro. Analysis of Molecular Variance inferred from Metric Distances among DNA Haplotypes - Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. Genetics. v.131, n.2, p.479-491, JUN. 1992.
- Faivovich, J., P. C. A. Garcia, *et al.* A molecular perspective on the phylogeny of the *Hyla pulchella* species group (Anura, Hylidae). Molecular Phylogenetics And Evolution, v.32, p.938-950. 2004.
- Faivovich, J., C. F. B. Haddad, P. C. A. Garcia, *et al.* Systematic review of the frog family hylidae, with special reference to hylinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. Bulletin of the American Museum of Natural History. v. 294, p. 6-228. 2005
- Ferreira, M. E. e D. Grattapaglia. Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética. 2ª ed. Brasília: EMBRAPA – CENARGEN, 1995. 220 p.
- Frost, D. R. Amphibian Species of the World: an online reference.: American Museum of Natural History, New York, USA. 2004.
- Giaretta, A. A., R. J. Sawaya, *et al.* Diversity and Abundance of Litter Frogs at Altitudinal sites at Serra do Japi, Southeastern Brazil. Revista Brasileira de Zoologia, v.14, n.2, p.341-346. 1997.
- Goin, C. J., Color Pattern Inheritance in Some Frogs of the genus *Eleutherodactylus*. Bulletin of the Chicago Academy of Sciences. v.9, n.1, p. 1-15. 1950.
- Gray, M. W., G. Burger, *et al.* Mithochondrial Evolution. Science, v.283, p.1476-1481. 1999.
- Haddad, C. F. B. Estudo da diversidade de espécies de anfíbios do Estado de São Paulo. 1996.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.
- Hartmann, M. T. Biologia Reprodutiva de uma Comunidade de Anuros (Amphibia) na Mata Atlântica (Picinguaba, Ubatuba, SP). (Tese de Doutorado). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, 2004. 136 p.
- Heyer, W. R. Variation, Systematics, and Zoogeography of *Eleutherodactylus guentheri* and Closely Related Species (Amphibia: Anura: Leptodactylidae). Smithsonian Contributions to Zoology, v.402, p.1-42. 1984.
- Heyer, W. R., A. S. Rand, *et al.* Frogs of Boracéia. v. 31, n.4, Arquivos de Zoologia. Museu de Zoologia do Estado de São Paulo. 1990.

- Höbel G. Notes on the natural history and habitat use of *Eleutherodactylus fitzingeri* (Anura : Leptodactylidae). Amphibia-Reptilia. v.20. n.1. p.65-72. FEB. 1999.
- Hoffman EA, Blouin MS A review of colour and pattern polymorphisms in anurans. Biological Journal of the Linnean Society. v. 70, n.4, p.633-665. AUG. 2000
- Kageyama, P. Y., F. B. Gandara, L. M. I. Souza. Conseqüências Genéticas da Fragmentação sobre Populações de Espécies Arbóreas. Série Técnica IPEF. v.12, n.32, p. 65-70. 1998.
- Kimura, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Ecology. v. 16, p. 111-120. 1980.
- Kumar, S., K. Tamura & M. Nei. MEGA, Molecular Evolutionary Genetic Analysis ver. 3.1. The Pennsylvania State University, University Park, PA 16802. 2004.
- Lourenço, L. B., P. C. A. Garcia, *et al.* Restriction fragment analysis of the ribosomal DNA of *Paratelmatobius* and *Scythrophrys* species (Anura, Leptodactylidae). Genetics and Molecular Biology, v.26, n.2, p.139-143. 2003.
- Lutz, B. The Hatching of *Eleutherodactylus parvus*. Copeia, n.1, p.64. 1944.
- Manna de Deus, J.R.; et al Plano de Manejo para o Parque Municipal da Serra do Itapety – Programa de Flora . XLII Congresso Nacional de Botânica, Goiânia, Goiás, 1995.
- Medeiros, J. D. A Biotecnologia e a Extinção de Espécies. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, v.30, p.109-113. 2003.
- Patton, J. L., M. N. F. D. Silva, *et al.* Hierarchical genetic structure and gene flow in three sympatric species of Amazonian rodents. Molecular Ecology, v.5, p.229-238. 1996.
- Pearman, P. B. Correlates of Amphibian Diversity in an Altered Landscape of Amazonian Ecuador. Conservation Biology. v.11, n.5, p.1211-1225. 1997.
- Perez-Sweeney B. M., F. P. Rodrigues, D. J. Melnick, Metodologias Moleculares utilizadas em Genética da Conservação. In: Cullen Jr, L., R. Rudran, *et al.* Métodos de Estudos em Biologia da Conservação e Manejo da Vida Silvestre. Curitiba: Editora da Universidade Federal do Paraná. 2003. 667 p.
- Santos, F. R., P. E. M. Guimarães, *et al.* Bancos de DNA: coleções estratégicas para estudos da biodiversidade. Lundiana, v.3, n.2, p.93-98. 2002.
- SBH. 2005. Lista de espécies de anfíbios do Brasil. Sociedade Brasileira de Herpetologia (SBH). Disponível em:  
<http://www.sbherpetologia.org.br/checklist/anfibios.htm> , acessado em 22 de janeiro de 2006.

- Schlapfer, M. A. e T. A. Gavin. Edge Effects on Lizards and Frogs in Tropical Forest Fragments. Conservation Biology, v. 15, n. 4, p. 1079 – 1090. 2001.
- Schneider, S., D. Roessli & L. Excoffier. Arlequin ver. 2.000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Secchi, E. R., J. Y. Wang, *et al.* Population differentiation in the franciscana (*Pontoporia blainvillei*) from two geographic locations in Brazil as determined from mitochondrial DNA control region. Can. J. Zool., v.76, p.1622-1627. 1998.
- Silva, A. P., P. C. A. Garcia, *et al.* Chromosomal and molecular analyses of *Leptodactylus gracilis gracilis*, *L. gracilis delattini*, and *L. plaumanni* (Anura, Leptodactylidae): taxonomic implications. Amphibia-Reptilia, n. 25, p.185-196. 2004.
- Siqueira-Jr., S., F. Ananias, *et al.* Cytogenetics of three Brazilian species of *Eleutherodactylus* (Anura, Leptodactylidae) with 22 chromosomes and re-analysis of multiple translocations in *E. binotatus*. Genetics and Molecular Biology, v.27, n.3, p.363-372. 2004.
- Solé-Cava A. M., Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: Matioli, S. R. Biologia Molecular e Evolução. Ribeirão Preto: Holos. 2001. 202 p.
- Sumida M, Ogata M Intraspecific differentiation in the Japanese brown frog *Rana japonica* inferred from mitochondrial DNA sequences of the cytochrome b gene Zoological Science. 15 (6): 989-1000 DEC 1998.
- Telles, M. P. D. C., M. S. R. Monteiro, *et al.* Marcadores RAPD na Análise da Divergência Genética entre Raças de Bovinos e Número de *Locos* Necessários para a Estabilidade da Divergência Estimada. Ciência Animal Brasileira, v.2, n.2, p.87-95. 2001.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research, 1994.
- Tomasulo, P. L. B. e I. Cordeiro. Composição florística do Parque Municipal da Serra do Itapety. Boletim do Instituto de Botânica, v.14, p.139-161. 2000.
- Vigilant L, R. Pennington, H. Harpending, *et al* Mitochondrial DNA Sequences in Single hairs from a Southern African Population. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. v.86, n.23, p. 9350-9354. DEC. 1989.
- Wilson, E. O. Biodiversidade. Rio de Janeiro: Nova Fronteira. 1997. 657 p.

Wong, K. L., J. Wang, *et al.* Application of cytochrome b DNA sequences for the authentication of endangered snake species. Forensic Science International, v.139, p.49-55. 2004.

Zar, J.H. Biostatistical analysis. Prentice-Hall, New Jersey. 1999. 718 p.

## ANEXO 1

### PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL

- Hidratar as amostras de tecido com 500  $\mu$ l de TE<sup>1</sup> (pH 7,5) e trocar a solução a cada 20 minutos por 3 vezes.
- Adicionar 500  $\mu$ l de STE<sup>2</sup> e macerar com uma ponteira fechada em chama.
- Adicionar 30  $\mu$ l de SDS 10%.
- Adicionar 10  $\mu$ l de proteinase K.
- Colocar em banho-maria a 37 C por 1 hora.
- Adicionar 500  $\mu$ l de NaCl 5M.
- Centrifugar por 10 minutos a 14.000 rpm.
- Transferir o sobrenadante para um tubo eppendorf de 2 ml sem pegar o pellet.
- Adicionar 30  $\mu$ l de acetato de sódio.
- Adicionar 1 ml de etanol absoluto gelado.
- Deixar overnight no freezer -20 C.
- Centrifugar por 30 minutos a 4 C a 14.000 rpm.
- Jogar o sobrenadante na pia sem descartar o pellet.
- Adicionar 600  $\mu$ l de etanol 70%.
- Centrifugar por 1 minuto a 14.000 rpm.
- Descartar o sobrenadante sem perder o pellet.
- Secar na secadora a vácuo por aproximadamente 15 minutos.
- Hidratar com 50  $\mu$ l de TE<sup>1</sup>.
- Deixar overnight na geladeira.
- Incubar no freezer -20 C.

## ANEXO 2

### PROTOCOLO PARA PCR

- Para 50 µl de solução:
  - 40 µl de H<sub>2</sub>O milliQ.
  - 5 µl de buffer + MgCl<sub>2</sub>.
  - 0,5 µl de primer MVZ 36.
  - 0,5 µl de primer MVZ 55.
  - 1 µl de DNTP's.
  - 1 µl de Taq Polimerase.
  - 2 µl de DNA.
  
- Programa do termociclador:
  - 1- 94 C – 1 minuto.
  - 2- 94 C – 1 minuto.
  - 3- 58,2 C – 1 minuto.
  - 4- 72 C – 1 minuto.
  - 5- 35 vezes a partir do passo 2.
  - 6- 72 C – 6 minutos.
  - 7- 4 C - ∞
  - 8- End.

## ANEXO 3

### PROTOCOLO PARA SEQÜENCIAMENTO

- Transferir as amostras resultantes de PCR para um tubo Eppendorf de 1,5 ml.
- Adicionar 5 µl de acetato de sódio e 150 µl de etanol absoluto gelado.
- Centrifugar a 14000 rpm por 20 minutos a 4°C
- Jogar fora o etanol sem descartar o pellet.
- Adicionar 600 µl de etanol 70%.
- Centrifugar por 1 minuto a 14000 rpm.
- Jogar fora o etanol sem descartar o pellet.
- Deixar secar na Speed Vac por aproximadamente 15 minutos.
- Hidratar com 50 µl de H<sub>2</sub>O milliQ.
- Se precisar, armazenar em freezer -20°C.

#### Preparar uma solução final de 10 µl:

- 2 µl de H<sub>2</sub>O milliQ.
- 2 µl da solução com DNA.
- 3 µl de “Save Money”.
- 1 µl de primer.
- 2 µl de “Big Dye” v 2.0.

#### Colocar no termociclador, programa seq 1:

1. 96°C – 1 minuto
2. 96°C – 20 segundos
3. 52°C – 20 segundos
4. 60°C – 4 minutos
5. 34 vezes a partir do passo 2
6. 4°C - ∞
7. End.

#### Fazer a precipitação de reação de seqüência:

- Adicionar 80 µl de isopropanol 75%.

- Transferir para um tubo Eppendorf de 1,5 ml.
- Repousar por 10 minutos.
- Centrifugar a 3000 rcf por 3 minutos.
- Desprezar o sobrenadante com uma pipeta.
- Adicionar 200  $\mu$ l de etanol 70%.
- Dar uma batidinha no fundo do tubo.
- Centrifugar a 3000 rcf por 5 minutos.
- Se precisar, incubar no freezer  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Ressuspender a reação:

- Ressuspender com 10  $\mu$ l de formamida.
- Transferir para uma placa.
- Colocar no termociclador no programa “denature”:  $95^{\circ}\text{C}$  – 5 minutos.
- Colocar imediatamente no gelo até esfriar.
- Sequenciar.



## ANEXO 4

## SEQÜENCIAMENTO

**1.1.136**

CGAAAATTCNAAGATGAGTTTAGCTAGTGGGCGAAAATTGAGTGTTTCGTTGTGC  
 AGAGCAAGTGGAGTGTGGGTACGGACTACTTACAGCATGAGGNTGGATGAAAGG  
 AGGGCTAAGACGCCTCCCAGTTTATTAGGGGTAGAGCGAAGGATGGCATAAGCG  
 AATAGGAAATACCACTCAGGCTTGATGTGGGGTGGGGTAATTAGGGGGTCTGCC  
 GGGGAAAAGTTGTCTGGGTCTCCTAGGATGTTAGGAAAGAAAGTTGATATAGTCA  
 AGATTAGTGAAATAAGAATAGAAAATCCGAAAATGTCTTTAATAGAGAAGTAGG  
 TGTGGAATGATATTTTATCGAGGTTAGAGTTGAGTCCTATGGGGTTAGAGGATCC  
 AGTTTCATGAAGAAATATTAGGTGAAGAATGGTCGTACCGGTGACGAGAAATGG  
 GAAAATAAAGTGGAAGGTAAAAAATCGGGTAAGAGTTGCGTTATCTACGGAAAA  
 ACCTCCTCAAATTCATTGTACAAGGTCTTGCCCCACGTAGGGGATGGCAGAAAGT  
 AGGTTAGTAATTACTGCAGCCCCTCAGAATGATATTNGNNCCCNAAA

**1.1.146**

CNCANTCCNNTGATGAGTTTAGCTAGTGGGCGAAAATTGAGTGTTTCGTTGTGCAG  
 AGAAGTGGAGTGTGGGTAGCGACTATTAAGATGAGGATGGATGAAAGGAGGGCT  
 AAGACGCCTCCCAGTTTATTAGGGGTAGAGCGAAGGATGGCATAAGCGAATAGG  
 AAATACCACTCAGGCTTGATGTGGGGTGGGGTAATTAGGGGGTCTGCGGGGGAA  
 AAGTTGTCTGGGTCTCCTAGGATGTTAGGAAAGAAAGTTGATATAGTCAAGATTA  
 GTGAAATAAGAATAGAAAATCCGAAAATGTCTTTAATAGAGAAGTAGGTGTGGA  
 ATGATATTTTATCGAGGTTAGAGTTGAGTCCTATGGGGTTAGAGGATCCAGTTTC  
 ATGAAGAAATATTAGGTGAAGAATGGTCGTACCGGTGACGAGAAATGGGAAAAT  
 AAAGTGGAAGGTAAAAAATCGGGTAAGAGTTGCGTTATCTACGGAAAAACCTCC  
 TCAAATTCATTGTACAAGGTCTTGCCCCACGTAGGGGATGGCAGAAAGTAGGTTA  
 GTAATTACTGCAGCCCCTCAGATGTTT

**1.1.180**

TCCGAAGATGATGTTTAGCTAGTGCGGCAGATAAATTGAGTGTTTCGTTGTGCAGA  
 GCAAGTGGAGTGTGNGGTACGCGACTATCTAAGATGAGGATCGGATGAAAGGAG  
 GGCTAANACGCCTNCCAGTTTATTAGGGGTACGAGCGAAGGATGGCATAAGCGA  
 ATAGGAAATACCACTCAGGCTTGATGTGGGGTGGGGTAATTAGGGGGTCTGCGG  
 GGGAAAAGTTGTCTGGGTCTCCTAGGATGTTAGGAAAGAAAGTTGATATAGTCAA  
 GATTAGTGAAATAAGAATAGAAAATCCGAAAATGTCTTTAATAGAGAAGTAGGT  
 GTGGAATGATATTTTATCGAGGTTAGAGTTGAGTCCTATGGGGTTAGAGGATCCA  
 GTTTCATGAAGAAATATTAGGTGAAGAATGGTCGTACCGGTGACGAGAAATGGG  
 AAAATAAAGTGGAAGGTAAAAAATCGGGTAAGAGTTGCGTTATCTACGGAAAA  
 CCTCCTCAAANTTCATTGTACAAGGTCTTGCCCCACGTAGGGGNATGGCAGAAA  
 GTAGGTTAAGTAAATTACTGCAGCCCCTNCAANAATTGATTTTTGGTCCCTTCAA  
 NAT

**1.1.213**

GNNNACCCTTAGGGTATTNTCTACGAAAATTCCNAAGATGAGTCTTAGCTAGTAG  
 NGGCGAAAATTGAGTGTTTCGTTGTAGCAGAGCAAGTGGAGTGTGNGGTAGCGAC  
 TATTACAGATGAGAGATGGATGAAAGGCAGGGCTAANACGCCTCCCAGTTTATTA  
 GGGGTAGAGCGAAGGATGGCATAAGCGAATAGGAAATACCACTCAGGCTTGATG  
 TGGGGTGGGGTAATTAGGGGGTCTGCGGGGGAAAAGTTGTCTGGGTCTCCTAGG  
 ATGTTAGGAAAAGAAAAGTTGATATAGTCAAGATTAGTGAAATAAGAATAGAAAAT  
 CCGAAAATGTCTTTAATAGAGAAGTAGGGTGTGGAATGATATTTTATCGANGTTAG  
 AGTTGAGTCCTATGGGGTTAGAGGATCCAGTTTCATGAAGAANTTTAGGTGAAGA  
 ATGGTCGTACCGGTGACGAGAAAATGGGAAATAAAGTGGANGTAAAAATTCGGGT  
 AAGAGTNNNNTATCTACGNAAAACCTCCTNAATTCATTGNCNANGNCTTGCCCN  
 CNTNGGGNNGNCAAAAGNNGGTTNNTNATNCTGCCCCCCNAAAAAANTTN  
 NNCCCNNA

**1.1.219**

NTNNGCTCGAAAATTCAGAAGATGAGTTTAGCTAGTGGGCGAAAATTGAGTGTTT  
 GTTGTGCAGAGAAGTGGAGTGTGGGTAGGACTATTAAGATGAGGATGGATGAAA  
 GGAGGGCTAAGACGCCTCCCAGTTTATTAGGGGTAGAGCGAAGGATGGCATAAG  
 CGAATAGGAAATACCACTCAGGCTTGATGTGGGGTGGGGTAATTAGGGGGTCTG  
 CGGGGGAAAAGTTGTCTGGGTCTCCTAGGATGTTAGGAAAAGAAAAGTTGATATAGT  
 CAAGATTAGTGAAATAAGAATAGAAAATCCGAAAATGTCTTTAATAGAGAAGTA  
 GGTGTGGAATGATATTTTATCGAGGTTAGAGTTGAGTCCTATGGGGTTAGAGGAT  
 CCAGTTTCATGAAGAAATATTAGGTGAAGAATGGTCGTACCGGTGACGAGAAAT  
 GGGAAAATAAAGTGGAAAGTAAAAAATCGGGTAAGAGTTGCGTTATCTACGGAA  
 AACCTCCTCAAATTCATTGTACAAGGTCTTGCCCCACGTAGGGGATGGCAGAAA  
 GTAGGTTAGTAATTAATGACAGCCCCTCAGAATGATATTNNNNCCCTNAA

**1.2.177**

GGAAATTTTGNTTAAACATAGGGTATTNTNTNCGAAAATNNNCAAGATGAGTTTA  
 GCTAGTGGGCGAAAATTGAGTTTTTCGTTGTGCAGAGAAGCGTAGTGTGGGTAGGA  
 CTATTAAGATGAGGATGGATGAAAGGAGGGCTAAGACGCCTCCCAGTTTATTAG  
 GGGTAGAGCGAAGGATNTNATAAGCGAATAGGAAATACCACTCAGGCTTGATGT  
 GGGGTGGGGTAATTAGGGGGTTTTNNGGGGAAAAGTTGTCTGGGTCTCCTAGGAT  
 GTTAGGAAAAGAAAAGTTGATATAGTCAAGATTAGTGAAATAAGAATAGAAAATCC  
 GAAAATGTCTTTAATAGAGAAGTAGGTGTGGAATGATATTTTATCGAGGTTAGAG  
 TTGAGTCCTATGGGGTTAGAGGATCCAGTTTCATGAAGAAATATTANGTGAAGAA  
 TGGTCGTACCGGTGACGAGAAAATGGGAAAATAAAGTGGAAAGTAAAAAATCGGG  
 TAAGAGTTGCGTTATCTACGGAAAACCTCCTCAAATTCATTGTACAAGGTCTTG  
 CCCCACGTAGGGGGATGGCANAAAAGTAGGTTAGTAATTAATGACAGCCCCTCAGA  
 ATGATATTNGNCCNCA

**1.2.178**

TTTTTAGNGTAAACACCAGCGGNATNTTTNTNCGAAAATTCANAAGATGAGTTTA  
 GCTAGTGGGCGAAAATTGAGTNTTCGTTGTGCAGAGAACTGNAGTGTGGGTAGG  
 ACTATTAAGATGAGGATGGATGAAAGGAGGGCTAAGACGCCTCCCAGTTTATTA  
 GGGGTAGAGCGAAGGATNNCATAAGCGAATAGGAAATACCACTCAGGCTTGATG  
 TGGGGTGGGGTAATTAGGGGGTCTGCGGGGGAAAAGTTGTCTGGGTCTCCTAGG

ATGTTAGGAAAGAAAGTTGATATAGTCAAGATTAGTGAAATAAGAATAGAAAAT  
 CCGAAAATGTCTTTAATAGAGAAGTAGGTGTGGAATGATATTTTATCGAGGTTAG  
 AGTTGAGTCCTATGGGGTTAGAGGATCCAGTTTCATGAAGAAATATTAGGTGAAG  
 AATGGTCGTACCGGTGACGAGAAATGGGAAAATAAAGTGGAAGGTAAAAAATCG  
 GGTAAGAGTTGCCGTTATCTACGGAAAACCTCCTCAAATTCATTGTACAAGGTC  
 TTGCCCCACGTAGGGGATGGCAGAAAGTAGGTTAGTAATTACTGCAGCCCCTCAG  
 AATGATATTGGNCCCTTCAA

### 1.2.182

CTCGAAAATTCCGAAGATGAGTTTAGCTAGTGGGCGAAAATTGAGTGTTTCGTTGT  
 GCAGAGAAGTGGAGTGTGGGTAGGACTATTAAGATGAGGATGGATGAAAGGAGG  
 GCTAAGACGCCTCCCAGTTTATTAGGGGTAGAGCGAAGGATGGCATAAGCGAAT  
 AGGAAATACCACTCAGGCTTGATGTGGGGTGGGGTAATTAGGGGGTCTGCGGGG  
 GAAAAGTTGTCTGGGTCTCCTAGGATGTTAGGAAAGAAAGTTGATATAGTCAAGA  
 TTAGTGAAATAAGAATAGAAAATCCGAAAATGTCTTTAATAGAGAAGTAGGTGT  
 GGAATGATATTTTATCGAGGTTAGAGTTGAGTCCTATGGGGTTAGAGGATCCAGT  
 TTCATGAAGAAATATTAGGTGAAGAATGGTCGTACCGGTGACGAGAAATGGGAA  
 AATAAAGTGGAAGGTAAAAAATCGGGTAAGAGTTGCGTTATCTACGGAAAACCC  
 TCCTCAATTCATTGTACAAGGTCTTGCCCCCGTAGGGGATGGCAGAAAGTAGGTT  
 AGTAATTACTGCAGCCCCTCANAATGATATTGNNCCCTNA

### 1.2.285

ANNTTNGGGGANANACAGGGAATNNTTTTTTCGAGAAATAACNCAAGATGAGTAA  
 TAGCTAGTGGGCGAAAATTGANTTTTCGTTGTGCAGANAANNGTNGTGTGGGNA  
 GGACTATTAAGATGAGGATGGATGAAAGGAGGGCTAAGACGCCTCCCAGTTTAT  
 TAGGGGTAGAGCGAAGGATNTNATAAGCGAATAGGAAATACCACTCAGGCTTGA  
 TGTGGGGTGGGGTAATTAGGGGGTTNNNGGGGAAAAGTTGTCTGGGTCTCCTAG  
 GATGTTAGGAAAGAAAGTTGATATAGTCAAGATTAGTGAAATAAGAATAGAAAA  
 TCCGAAAATGTCTTTAATAGAGAAGTAGGTGTGGAATGATATTTTATCGAGGTTA  
 GAGTTGAGTCCTATGGGGTTAGAGGATCCAGTTTCATGAAGAAATATTAGGTGAA  
 GAATGGTCGTACCGNGACGAGAAATGGGAAAATAAAGTGGAAGGTAAAAAAT  
 CGGGTAAGAGTTGCGTTATCTACGGAAAACCTCCTCAAATTCATTGTACAAGGT  
 CTTGCCCCACGTAGGGGATGGCAGAAAGTAGGTTAGTAATTACTGCAGCCCCTCA  
 GAATGATATTGGNCCTCAA

### 1.2.303

TATGGTTAANCATTAGGGTATTATTTTACGAAAATTCNGAAGATGAGTTTAGCTA  
 GTGGGCGAAAATTGATTGTTTCGTTGTGCAGAGAAGTGGAGTGTGGGTAGGACTAT  
 TAAGATGAGGATGGATGAAAGGAGGGCTAAGACGCCTCCCAGTTTATTAGGGGT  
 AGAGCGAAGGATGGCATAAGCGAATAGGAAATACCACTCAGGCTTGATGTGGGG  
 TGGGGTAATTAGGGGGTCTGCGGGGGAAAAGTTGTCTGGGTCTCCTAGGATGTTA  
 GGAAAGAAAGTTGATATAGTCAAGATTAGTGAAATAAGAATAGAAAATCCGAAA  
 ATGTCTTTAATAGAGAAGTAGGTGTGGAATGATATTTTATCGAGGTTAGAGTTGA  
 GTCCTATGGGGTTAGAGGATCCAGTTTCATGAAGAAATATTAGGTGAAGAATGGT  
 CGTACCGGTGACGAGAAATGGGAAAATAAAGTGGAAGGTAAAAAATCGGGTAA  
 GAGTTGCGTTATCTACGGAAAACCTCCTCAAATTCATTGTACAAGGTCTTGCCC

CACGTAGGGGATGGCAGAAAGTAGGTTAGTAATTACTGCAGCCCCTCAGANTGTT  
TNNNNCCCCNAA

### 2.1.259

CATTCCCAAGATGAGTTTAGCTAGTGGGCAGANAATTAAGTGTTCGNTGTAGCGG  
NGAAGTAGNGTGTGNGCCGGACTACTTACAGCATAGAGAGTNTNAGATGAAAN  
GNGGGCTAACGACNCCTCNCAGNTTATGNAGGCGTGTAGCAGCGGAAGGANTGG  
CATAANCGANTAGNAAGTCTNATTCANGCTTGATGTGGGGTGGGGNAATTAGGG  
GGNCTGCNNGGGGAAAAGNTGNCTGGCTCTCCTAGGATGTTNNGGANGAAAGTTG  
NTACAGTCAAAATTAGTGAAATAAGAATAGAAAATCCGAAAATGTCTTTAATGG  
AGAAGTAGGTGTGGAATGATATTTTATCGAGGTTAGAGTTGAGTCCTATGGGGTT  
AGAGGATCCGGTCTCATGAAGAAATATTAGGTGAAGAATGGTTGTACCGGTGAC  
GAGAAATGGGAAAATAAAGTGGAAGGTAAAAAATCGGGTAAGAGTTGCGTTATC  
TACGGAAAACCTCCTCAAATTCATTGTACAAGGTTTTGCCCCACGTAGGGGATG  
GCANNAAGTAGGTTAGTAATTACTGCAGCCCCTCAGAATGATATTNGNNCCNN  
AA

### 2.1.260

CCTTAGGGTATTANTCACGAAAATTCAGGAAGCATGAGTTTAGCTAGTGGGCGAA  
AATTAAGTGTTCGTCTGTAGCGGAGCAAGTGGAGTGTGGGCAGGACTACTTACAG  
CATGCAGAGATGGATGAAAGGAGGGCTAAGACGCCTCCCAGTTTATTAGGGGTA  
GAGCGAAGGATGGCATAAGCGAATAGGAAGTATCATTACAGGCTTGATGTGGGGT  
GGGGTAATTAGGGGGTCTGCGGGGGAAAAGTTGTCTGGGTCTCCTAGGATGTTAG  
GGAAGAAAGTTGATACAGTCAAATTAGTGAAATAAGAATANAAAATCCGAAAA  
TGTCTTTAATGGAGAAGTAGGTGTGGAATGATATTTTATCGAGGTTAGAGTTGAG  
TCCTATGGGGTTAGAGGATCCGGTCTCATGAAGAAATATTANGTGAAGAATGGTT  
GTACCNNGTGACGAGAAATGGGAAAATAAAGTGGAAGGTAAAAAATCGGGTNA  
GAGTTGCGTTATCTACGGAAAACCTCCTCAAATTCATTGTACAAGGTTTTGCCCC  
CGTNGGGGATGGCANAAAGTAGGTTANTAATTACTGCANCCCTCAAATGATNTTT  
NNCCT

### 2.1.261

GGATNTTTGGTTAACATAGGGTATTTTTTACGNAAATNANCAAGATGAGTNTAGC  
TAGTGGGCGAAAATTAANTTTTCGTTGTGCGGAGAACCGGAGTGTGGGCAGGACT  
ATTAAGATGAGGATGGATGAAAGGAGGGCTAAGACGCCTCCCAGTTTATTAGGG  
GTAGAGCGAAGGATGGCATAAGCGAATAGGAAGTATCATTACAGGCTTGATGTGG  
GGTGGGGTAATTAGGGGGTCTGCGGGGGAAAAGTTGTCTGGGTCTCCTAGGATGT  
TAGGGAAGAAAGTTGATACAGTCAAATTAGTGAAATAAGAATAGAAAATCCGA  
AAATGTCTTTAATGGAGAAGTAGGTGTGGAATGATATTTTATCGAGGTTAGAGTT  
GAGTCCTATGGGGTTAGAGGATCCGGTCTCATGAAGAAATATTAGGTGAAGAAT  
GGTTGTNCCGGTGACGAGAAATGGGAAAATAAAGTGGAAGGAAAAAATCGGGTA  
AGAGTTGCGTTATCTACGGAAAACCTCCTAAATTCATGNACAGGGTTTTGCCCCA  
CGNNGGGATGCANAANTAGNTAGTATTACNCAGCCCTAGANNATTTGGNCCNA  
A

**2.2.262**

GATGAANTTTGGCCTCGCNGGGCNGAAAGTTAAGTGTTCNGTTGTGCGGAGTAAG  
 CCGAAGTGAAGGTAGGATCATTAAAGATGAGGATAGATGAAAGGAGGGCCTAAGA  
 CACCCCCAGTTTATTAGGGGTTGAGCNGAAGGATGGCATAGGCAAACAAGAAA  
 TATCATTAGGCTTAATGTGGGGTGGGGTAGTTAGAGGGTCTGCGGGGAAAAGT  
 TATCTGGATCTCCCAGAGTGTGGGGAAAAAAGTTGATACAGTTGAAATTANTGA  
 AATANGAATAAAAAATCCGAAATGTCTTTTATAGAGAAGTNGGTGTGGANCGGT  
 NTTTTTGTCAAGGTTTNGAGCTNTAGNCCCNAGGGGGTTNGGAGGANCCGGGCTT  
 NATTGGNGGAACATNAGGTGGNANAATTNNATTTGCNCGNTCGCCGNTATACCG  
 GNAAAATAAAANTTAAAAAGNTGAAAGNATTCGGNTNNNNGNTTNCCTTTCGNTC  
 TNNNAAAANAACCNCNCCCCCAANTTNTTTNTNANNGGGGGTTTNTNCCCNTNC  
 NTNNGGTGANNGGGCGGGAAANNNTAGTTTGGGNGATTATNNTNNGNCCCNC  
 NCAAAAANGGGTTTTTCNNNCCCTNNGGCCCNNTNNNNNTATGNCCCNTCATCGTN  
 GAGNNGTTCNGCTNCANTTNNNANNCNTGGTCTGNTTNTCNGCCCNANCTATNG  
 CCCGNTTTNAANTTANTTTTNCCTCCTCCTTCTTTNTNTANNTCGNTGNN  
 CGNTNNNNNGNNNNNNCGATNNNNTTGNTNNGTNNNTNATTNNNCNCGTTTTNGN  
 TTNTTGANNCCNGCTCCGACNNTCTNANACGNCNTNGNNNGTCTNACNCNNTAT  
 ACTNTGCTNCAANNGCCNCCGTGNNNTTCAGNGACNNCTCGNGTCTTTTNTTTNT  
 NNTCTGNCTCCCTNTCTNNTTTCNTCNCNTNNNCATNNACTTANACATTTN

**2.1.263**

GGNNNAACCCNANNANNGNGTATTTTTTTTCNCTGNAAAATATCCNGGAAGCAT  
 GTAGATTTAGGCTAGTAGGNGCGATAAATTAAGTTGTTCGTTAGTGCGGCAGCAA  
 GCTGGAGTCGTGGAGCAGCGTACTACTCTACAGNATGCAGAGATANGATGAAAG  
 TGAGGAGCCTAAGGACGCCTCCCAGCTTTATTAGGGGTAGAGCGAAGGATGGCA  
 TAAGCGAATAGGAAGTCTCATTANGCTTGATGTGGGGTGGGGTAATTANGGGGT  
 CTGCGGGGGAAAAGTTGTCNGGGTCTCCTNGGATGTTACGGANGAAAGTTGATA  
 CAGTCANAATTAGTGAAATANGAATACATAATCCGANANTGTNTTTAATGGANA  
 ANTCAGNGTCGAATGNTATTTNATCNAGGCTAGAGTNGNNCCTATGGGGTCAG  
 AGGATCCNGTCTCATGAATAAATANTACGTGNAGNATGNTTGNACCNGTNACCN  
 AAAATGGCCAAATNANGCGGAAGGTA AAAATCNGNNNANAGTNNCNTTATCTAC  
 NGAAAACCTCCTCAAATTCATTGNNAAGGTTTTGCCCCACNTNGGGGATGGCN  
 NAAAGTNGGTTNNNAATTNCTGNANCCCTNAAAATGANTTTNNCC

**2.2.264**

TTANGGTTAANCNTTAGGGTATTATTTACGAAAATTCCCGAAGCATGAGTTTAG  
 CTAGTAGGGCGAAAATTAAGTTTTCGTTGTGCGGGAGTAACCGGAGTGTGGGCAG  
 GCTATTAAGATGAGGNTGGCATGAAAGGAGGGCTAAGACGCCTCCCAGTCTTATT  
 AGGGGTAGAGCGAAGGATGGCATAAGCGAATAGGAAGTNTCATTAGGCTTGAT  
 GTGGGGTGGGGTAATTAGGGGGTCTGCGGGGGAAAAGTTGTCTGGGTCTCCTAG  
 GATGTTAGGGAAGAAAGTTGATACAGTCAAATTAGTGAAATAAGANTAGAANA  
 TCCGAAAATGTCTTTAATGGAGAAGTAGGTGNGGAATGATATTTTATCGAGGTTA  
 GAGTTGAGTCCTATGGGCTAGAGGATCCGGTCTCATGAAGAAATATTAGGTGAAG  
 AATGGTTGTNCCGGTGACGAGAAATGGGAAAATAAAGTGGAAGGTA AAAATCGG  
 GTAAGAGTTGNGTTATCTACGGAAAACCTCNCAAATTCCTGNANANGGTTTGCC  
 CCACNTAGGGNNNGCAGAAAGTNGGTTAGNTAATTNCTGCCCCCCTCANANTN  
 NNTTTGNCCNCA

**2.2.265**

GATNTTAGGTTANCNTAACGTGTTATTTTACGAAAATTCAGGAAGCATGAATTTG  
 GCTAGCGGGCGAAAGTTAAGTGTTTCGTTAGTGCAGGAGCAAGTGAAGTGAAGGT  
 AGGATCATTAAAGATGAGGACACGATGTACAAGNCGGGCTAANTACACCCCCCAG  
 TTTATTAGGGGTTGAGCGAAGGATGGCATAGGCAAACAAGAAATATCATTACAGG  
 CTTAATGTGGGGTGGGGTAGTTAGAGGGTCTGCGGGGGAAAAGTTATCTGGATCT  
 CCCAGAGTGTTGNGGANAAAAGTTGATACAGTTGAAATTAATGAAATAAGAATA  
 AAAAATCCGAAAATGTCTTTAATAGAGAAGTAGGTGTGGAACGGTATTTTGTCAA  
 GGTTAGAGTTTAGTCCTAGGGGTTAGAGGATCCGGTTTCATGGAGNACATGAGGT  
 GGAAATAGATGTGCCGATGACGATAAACGGAAAANAAAGTGAAANGTNANAAT  
 NGGGTANGGGTNGCGTTGNTNCCANNAACCCCCCNAACTCATTGNNCANGG  
 TTTTGCCCTNCNTNNGGGGATNGNNGAAAANNAATTNGGNNNTTCCNGCNCNCCCCT  
 NAAANNNATTTTNNNCC

**2.2.266**

TAGGTTAACATAGGGTATTATTTACGAAAATTCANGAAGATGAGTTTAGCTAGT  
 GGGCGAAAATTAAGTGTTTCGTTGTGCGGAGAAGTGGAGTGTGGGCAGGACTATT  
 AAGATGAGGATGGATGAAAGGAGGGCTAAGACGCCTCCCAGTTTATTAGGGGTA  
 GAGCGAAGGATGGCATAAGCGAATAGGAAGTATCATTACAGGCTTGATGTGGGGT  
 GGGGTAATTAGGGGGTCTGCGGGGGAAAAGTTGTCTGGGTCTCCTAGGATGTTAG  
 GGAAGAAAGTTGATACAGTCAAATTAGTGAAATAAGAATAGAAAATCCGAAA  
 TGTCTTTAATGGAGAAGTAGGTGTGGAATGATATTTTATCGAGGTTAGAGTTGAG  
 TCCTATGGGGTTAGAGGATCCGGTCTCATGAAGAAATATTAGGTGAAGAATGGTT  
 GTACCGGTGACGAGAAATGGGAAAATAAAGTGGAAAGGTAATAAATCGGGTAAG  
 AGTTGCGTTATCTACGGAAAACCTCCTCAAATTCATTGTACAAGGTTTTGCCCA  
 CGTAGGGGATGGCAGAAAGTAGGTTAGTAATTACTGCAGCCCCTCAGATGTTTTG  
 NNCCCCCAA

**2.2.267**

TTTTNNGGTNACCNTAACGTGTTTTTTACGAAAATTCAGGAAGNATGAATTTGG  
 CTAGCGGGCGAAAGTTAAGTGTTTCGTCTGTGCGGAGCAAGTGAAGTGAAGAGTA  
 GGATCATTAAAGATGAGGTATACGATGAAAGGAGGGCTAAGACACCCCCCAGTTT  
 ATTAGGGGTTGAGCGAAGGATGGCATAGGCAAACAAGAAATATCATTACAGGCTT  
 AATGTGGGGTGGGGTAGTTAGAGGGTCTGCGGGGGAAAAGTTATCTGGATCTCCC  
 AGAGTGTTGGGGAAAAAAGTTGATACAGTTGAAATTAATGAAATATGAATAANA  
 TATCCGAAAATGTCTTTAATAGAGAAGTANGTGTNGAACGGTNTTTTGTCAAGGN  
 TAGAGTNTANTCCTAAGGGNTAGAGGATCCGGTTTCTGGNGGAACNTGAGNNGN  
 GAATNNATTCCCGNTGNCNTTAACCGNAAATTAAGNGAAANGGAAAATCGGGT  
 AGGGTTGCNTTNTNNAAAAAACCCCCCNANCNNTTTTCCAAGGTTTNNCCNN  
 CNTNNGGGTNGNNGAAANNANNTNGGNNTTTCNNCCCCCCCCNCAATNANTTTT  
 NNNCC

**2.2.268**

TTAGGTTACCATTAAACGTGTTTTTACGAAAATTCNGAAGATGAATTTGGCTAGCG  
 GCGGAAAGTTAAGTGTTTCGTTGTGCGGAGAAGTGAAGTGAAGAGTAGAGATCAT  
 TAAGATGAGAGATAGATGAAAGGAGAGGCTAAGACACCCCCCAGTTTATTAGGG  
 GTTGAGCGAAGGATGGCATAGGCAAACAAGAAATATCATTACAGGCTTAATGTGG

GGTGGGGTAGTTAGAGGGTCTGCGGGGGAAAAGTTATCTGGATCTCCCAGAGTGT  
TGGGGAAAAAAGTTGATACAGTTGAAATTAATGAAATAAGANTAAAAATCCNAA  
AATGTCTTTAATAGAGAAGTAGGTGTGGAACGGTATTTTGTCAAGGTTAGAGTTT  
ANTCCTAANGGGTTAGANGATCCCGGTTCTTGGNGGACNTGAGGGGGGGAATN  
NNTGTGCCNNTGNCNATNANCGGNAAANTAANNNGAAANNGNANAATNNGGTN  
ANGGNTGCCTTNCNCCAAAAANCCCCCAANNTCTTTTNCNCAAGGGTTTCC  
CCNCCNNNGGGGTNGGGGGNAANNANNNNGGNNTTCCCCCCCCCCCCNCNAA  
ANNNTTTTNNCCNC