Carolina Elena Viña Bertolotto

***Enyalius* (Leiosauridae, Squamata):
o que os dados moleculares e cromossômicos
revelam sobre esse gênero de lagartos endêmico
do Brasil**

**Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo,
para a obtenção de Título de Doutor em
Ciências, na Área de Biologia / Genética.**

Orientadora: Yatiyo Yonenaga-Yassuda

Versão revisada

São Paulo

2006

Ficha Catalográfica

Viña Bertolotto, Carolina Elena

***Enyalius* (Leiosauridae, Squamata): o que os dados moleculares e cromossômicos revelam sobre esse gênero de lagartos endêmico do Brasil**

129 páginas

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. *Enyalius* 2. Citogenética. 3. Sequências mitocondriais e nucleares. 4. Filogenia

I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora

Prof. Dr (a)

Prof. Dr (a)

Prof. Dr (a)

Prof. Dr (a)

Profa. Dra Orientadora

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e meu irmão

EPÍGRAFE

*Caminante, son tus huellas
el camino nada más;
caminante no hay camino
se hace camino al andar.
Al andar se hace camino,
y al volver la vista atrás
se ve la senda que nunca
se ha de volver a pisar
Caminante, no hay camino,
si no estelas en la mar*

**(Proverbios y Cantares. XXIX
Antonio Machado)**

AGRADECIMENTOS

Esta Tese de Doutorado foi feita com muitas mãos e idéias de pessoas que me acompanham há muito tempo, e há não tanto tempo assim. Parte delas não só na vida acadêmica.

Impossível citar todas essas pessoas, mas não posso deixar de agradecer,

À minha orientadora Dra Yatiyo Yonenaga-Yassuda, por me acolher no laboratório por 14 anos (caramba, passa rápido mesmo), pelo conhecimento transmitido e liberdade para trabalhar durante todo esse período.

A meu orientador informal Dr. Miguel T. Rodrigues, sempre entusiasmado com os lagartos, por ter sempre me ajudado, trazendo e pedindo os “bichinhos” e oferecendo suporte intelectual em todos esses anos de pesquisa.

Aos meus amigos e colegas de Laboratório Karen Ventura, Yukie Sato, Tais Machado, Marcinha, Glaciene, Beto e Marcos Souza pelas inúmeras ajudas, companheirismo e alegria. Em especial a Glaciene, Tais e Yukie, pela amizade. A Vava, Valeria Fagundes, que também um dia fez parte deste laboratório, pelas ajudas.

Ao amigo Rodrigo Santos, fiel escudeiro em todas as horas, meu companheiro de molecular, sempre prestativo e bem humorado, pelas inúmeras ajudas e discussões, principalmente nos dias que precederam à tese.

À Silvia, que insiste em dizer que é má, pelas várias orientações, discussões e ajudas na molecular (estrutura secundária do 16S, cálculo dos tempos de divergência, e assim vai). Em todo caso, obrigada por não ser má comigo.

À Renata Cicília Amaro, minha funcionária nota 10, cuja ajuda no final da tese foi crucial (refazer toda a tabela, o Mapa e outras “coisinhas”), pelos anos de amizade, coleguismo, ajudas e muitas risadas.

À Mariiiiiia, Maria José de Jesus Silva, minha querida amiga de sempre, um pouco orientadora, um pouco mãe, de tudo um pouco, sempre presente.

À Pepe, Kátia Pellegrino, que também como Maria José, me orientou desde o começo até hoje. Orientadora “não cadastrada” foi quem efetivamente orientou meu doutorado, me ensinando todos os “passos da molecular”. Amiga sempre presente mesmo tendo passado muito tempo longe de mim.

Aos amigos de fora da Bio, Roberto Castro, Maria Margarida, Vretinhos (Christina Vretos) e Ana Carina Ometto. Amigos de todas as horas, da vida inteira.

Às amigas e colegas de ensino, Kátia Faria e Luciana Alvarez, sempre dispostas a me liberarem dos compromissos com o ensino para que eu me dedicasse à Tese.

A Patrícia Faria, pela amizade e companheirismo.

Aos amigos do Laboratório de Aves do IBUSP, em especial ao Fábio e ao Zé Patane, pela ajuda com a “molecular”. Aos amigos do laboratório dos peixes, Cíntia, Fátima, Riviane, Sabrina, Carlos e do laboratório da Maria Lúcia, Ana Carolina e Zé Carlos, ao Lincão e ao Severino pelos momentos agradáveis e ajudas.

Aos meninos do Miguel (aqui incluídas as meninas também) Felipe, Dante, José Cassimiro, Vanessa, Gabriel Skuk, Renata Moretti, Vinícius, pelos animais coletados e pelas muitas ajudas extras. Sem o trabalho dessa equipe esta Tese não existiria, não com essa

quantidade de exemplares de tão diversos locais. Ao gringo, Ricardo Fuentes, pelas conversas e amizade.

Aos muitos docentes de várias Universidades que me mandaram tecidos de *Enyalius* de diversas localidades. E aos não docentes também.

A todos os professores do Instituto de Biociências pelo conhecimento passado. Em especial a Maria Lucia Benozatti, Ângela Morgante e José Mariano Amabis.

Aos funcionários deste Instituto, todos.

À minha família distante e sempre presente, começo de tudo. E a nova integrante dela, Alexandra, minha cunhada.

Aos meus pais e meu irmão,..... meu profundo amor.

INDICE

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
INTRODUÇÃO.....	1
I.1.SISTEMÁTICA.....	1
1.2. CITOGENÉTICA.....	14
❖ Considerações gerais sobre os estudos citogenéticos em lagartos.....	16
❖ Cariótipos dos iguania pleurodontes.....	21
1.3. ESTUDOS MOLECULARES.....	25
❖ Análise das seqüências gênicas.....	26
❖ Escolha dos genes.....	28
❖ Genes mitocondriais.....	30
❖ Genes nucleares	33
❖ Métodos de reconstrução filogenética.....	34
❖ Índices de suporte dos clados.....	38
❖ Hipóteses filogenéticas.....	39
❖ Estudos moleculares combinados com outros dados	41
II. OBJETIVOS.....	45
III. MATERIAL.....	46
IV. MÉTODOS.....	55
IV. ESTUDOS CITOGENÉTICOS.....	55
IV.1.1.A. Preparações diretas.....	55
IV.1.B. Técnicas de coloração.....	57
IV.1.C. Análises cromossômicas.....	58
IV. 2. ESTUDOS MOLECULARES.....	58
IV. 2.1.a. Extração de DNA.....	59

IV.2.1.b. Amplificação das regiões gênicas.....	61
IV. 2.1.e. Obtenção e análise das sequências.....	63
IV. 2.1.d. Análises filogenéticas.....	64
IV. 2.1.c. Produtos, condições de armazenamento e preparo de soluções.....	65
V. RESULTADOS.....	71
VI. DISCUSSÃO.....	102
VII. CONCLUSÕES.....	109
VIII. REFERÊNCIAS.....	111

RESUMO

Estudos citogenéticos e moleculares realizados em 116 exemplares de lagartos do gênero *Enyalius*, provenientes de 58 localidades do Brasil, revelam grande variação cariotípica ($2n=36$ a $2n=46$) e significativa diversidade de espécies. Segundo a última grande revisão, o gênero *Enyalius* estaria composto por seis espécies, duas delas politípicas: *E. bilineatus*, *E. brasiliensis* (*E. b. boulengeri* e *E. b. brasiliensis*), *E. catenatus* (*E. c. catenatus*, *E. c. bibroni* e *E. c. pictus*), *E. iheringii*, *E. leechii* e *E. perditus*.

A partir de reconstruções filogenéticas utilizando seqüências combinadas de regiões parciais dos genes mitocondriais *cyt b*, ND4 e 16S e do gene nuclear *c-mos*, com os métodos de máxima parcimônia, máxima verossimilhança e inferência bayesiana, é proposta uma hipótese filogenética para o gênero. Dois grandes clados são observados: **clado 1** composto pelas espécies *E. brasiliensis*, *E. iheringii* e *E. perditus* e o **clado 2** formado por *E. bibroni*, *E. bilineatus*, *E. catenatus*, *E. leechii*, *E. pictus* e três novas espécies. Delimitando geograficamente a ocorrência desses 2 clados está o Rio Doce: ao sul deste está o clado 1 e ao norte, o clado 2. Os rios Jequitinhonha e o Rio São Francisco também delimitam a ocorrência das espécies *E. pictus* e *E. catenatus*, respectivamente. De acordo com essa filogenia molecular, associada a dados morfológicos, o gênero *Enyalius* está composto de, pelo menos, 11 espécies, considerando as subespécies de *E. catenatus* como espécies válidas e as populações de Mucugê (BA), Serra da Jibóia (BA) e Ibateguara e São José da Laje (AL) como três espécies novas.

Resultados cariotípicos inéditos são apresentados para duas espécies deste gênero: *E. pictus* ($2n=36$, $12M+24m$) e a espécie nova de Mucugê (BA), com o surpreendente número diplóide $2n=46$, $22M+24m$. Este cariótipo é muito distinto da maioria das espécies de *Enyalius*, sendo composto por 22 macrocromossomos acrocêntricos e 24 microcromossomos.

ABSTRACT

Cytogenetic and molecular studies were performed in 116 lizard of the genus *Enyalius*, from 58 localities of Brasil. A large karyotype variability with diploid number ranging from $2n=36$ to $2n=46$ and a conspicuous diversity of species were detected. Based on the last major revision on the genus, six species, two of the them with subspecies, were recognized: *E. bilineatus*, *E. brasiliensis* (*E. b. boulengeri* and *E. b. brasiliensis*), *E. catenatus* (*E. c. catenatus*, *E. c. bibroni* and *E. c. pictus*), *E. iheringii*, *E. leechii* and *E. perditus*.

Here, a molecular phylogeny was reconstructed for the genus using mitochondrial (cytochrome *b*, ND4 and 16S) and nuclear (*c-mos*) DNA sequences. Maximum parsimony and maximum likelihood criteria, as well as Bayesian analyses, were carried out on separate and combined sequences. According to this hypothesis, the species of *Enyalius* are grouped into two major clades: **clade 1** assembling *E. brasiliensis*, *E. iheringii* and *E. perditus*, and **clade 2** that includes *E. bibroni*, *E. bilineatus*, *E. catenatus*, *E. leechii*, *E. pictus* and three new species. The geographical distribution of these two clades coincides with the limits of Rio Doce at south (clade 1) and north (clade 2). The Jequitinhonha and São francisco rivers also delimit the occurrence of *E. pictus* and *E. catenatus*, respectively. Based on our phylogenetic hypothesis and morphological data, we propose that the genus *Enyalius* is actually comprised of, at least, 11 species.

Chromosomal results for two species are here described for the first time: *E. pictus* ($2n=36$, $12M+24m$) and a new species from Mucugê (BA) that present a surprising diploid number $2n=46$, $22M+24m$. This karyotype with $2n=46$ formed by 22 acrocentric macrochromosomes is very distinct from those found in most species of the genus.

I. INTRODUÇÃO

I.1. SISTEMÁTICA

Assim como em outros vertebrados, dificuldades no esclarecimento das relações de parentesco e problemas sistemáticos são encontrados nos vários táxons de lagartos. Estudos utilizando dados cromossômicos, morfológicos e moleculares têm contribuído para o esclarecimento de muitas dessas relações. No entanto, muito trabalho ainda é necessário neste grupo, principalmente à medida que novos dados sobre espécies e populações tornam-se disponíveis.

Os lagartos são abundantes nos trópicos, em todos os continentes, exceto na Antártida, nos mais variados tipos de ambiente. As cerca de 4100 espécies descritas até o momento (POUGH e col., 2004), estão agrupadas em 17 famílias e estas arrançadas em 4 infraordens: **Iguania**, **Gekkota**, **Scincomorpha** e **Anguimorpha**. Juntamente com as anfisbenas, as serpentes e os dibamídeos, formam o táxon monofilético Squamata (ESTES e col., 1988; Tabela 1).

Tabela 1. Taxonomia filogenética de Squamata baseada em morfologia (ESTES e col., 1988)

Iguania
Iguanidae
Acrodonta
Agamidae
Chamaeleontidae
Scleroglossa
Incertae sedis: Dibamidae, Amphisbaenia, Serpentes
Gekkota
Gekkonidae
Pygopodidae
Scincomorpha
Lacertoidea
Xantusiidae
Lacertiformes
Lacertidae
Teiioidea
Teiidae
Gymnophthalmidae
Scincoidea
Scincidae
Cordylidae
Anguimorpha
Anguidae
Xenosauridae
Varanoidae
Helodermatidae
Varanidae
<i>Lanthanotus</i>
<i>Varanus</i>

Estudos morfológicos concordam na dicotomia basal entre Iguania e Scleroglossa, com alguns dos principais agrupamentos, tais como Acrodonta e Anguimorpha e com a relação próxima entre as serpentes, os dibamídeos, as anfisbenas e os lagartos (ESTES e col., 1988; LEE e CALDWELL, 2000). Entretanto, as relações filogenéticas entre vários táxons de Squamata, com base em caracteres morfológicos, são incertas. ESTES e col. (1988) consideraram os táxons Iguanidae e Agamidae como metatáxons, não sendo nem monofiléticos nem tampouco parafiléticos. Na filogenia abaixo (Figura 1) estão representadas as 17 famílias de lagartos e inseridos no meio destas estão as anfisbenas, as serpentes e os dibamídeos, revelando que os lagartos constituem um agrupamento parafilético.

Figura 1. Filogenia de Squamata com base em dados morfológicos. As anfisbenas, os dibamídeos e as serpentes não mostram posição definida (circundados em preto). A família Iguanidae aparece dividida em 8 subfamílias (ESTES e col., 1988). Os números referem-se aos diferentes clados.

Existem poucos estudos que investigam as relações filogenéticas em Squamata com base em dados moleculares. HARRIS e col. (2001) e HARRIS (2003) utilizaram seqüências de aproximadamente 360 pares de bases (pb) do gene nuclear *c-mos* para reconstruir as relações dentro de Squamata. Em um estudo mais amplo, TOWNSEND e col. (2004) analisaram seqüências parciais dos genes nucleares *c-mos* (360pb) e *RAG-1* (2750pb) e do gene mitocondrial *ND2* (1500pb) de várias espécies de Squamata. Em todos esses trabalhos os autores encontraram resultados que discordam dos morfológicos, como a ausência de monofiletismo de Scleroglossa, a localização interiorizada de Iguania e a origem independente das serpentes, anfisbenas e os dibamídeos. A redução de membros teria surgido numerosas vezes dentro de Squamata. O monofiletismo de todas as famílias de lagartos foi recuperada, inclusive para Agamidae. Estes autores também observaram a relação próxima entre os dibamídeos e os geconídeos, e as anfisbenas e os lacertílios. A posição das serpentes não pôde ser resolvida (Figura 2). HEDGES (2004) usando fragmentos dos genes nucleares *c-mos* e *RAG-1*, investigou a posição das serpentes em Squamata e encontrou forte suporte para a posição destas fora de Anguimorpha, contrariando os achados morfológicos.

Figura 2. Relações filogenéticas em Squamata baseadas em dados de seqüência dos genes nucleares *c-mos* e *RAG-1* e do gene mitocondrial *ND2* (TOWNSEND e col., 2004, com modificações).

O gênero *Enyalius* pertence a infraordem Iguania, família Iguanidae (BOULENGER, 1885). Segundo ESTES e col. (1988), Iguania compreende três famílias: Chamaeleontidae, Agamidae e Iguanidae (Tabela 1; Figura 1). A família Iguanidae está composta por todos os iguania não-acrodontes e contém cerca de 908 espécies que ocupam uma variedade de tipos de habitat (desertos, florestas tropicais, montanhas e regiões costeiras) e estão distribuídas ao longo do continente americano, incluindo as ilhas do Caribe e de Galápagos, e três gêneros isolados: *Chalarodon* e *Oplurus* em Madagascar, e *Brachylophus*, nas ilhas Fiji e Tonga (POUGH e col., 2004). Na filogenia da Figura 1, esta família se encontra desmembrada em 8 subfamílias. Entretanto, existe na literatura uma falta de consenso a respeito do status dessa família. Até o estudo realizado por ESTES e col. (1988), o monofiletismo de Iguanidae não havia sido investigado, apenas alguns autores descreveram grupos supragenéricos, como, por exemplo, os iguaníneos, sceloporíneos, anolóides e tropiduríneos (ETHERIDGE, 1959). ESTES e col. (1988) não encontraram evidências que sustentassem o monofiletismo da família, resultado este também observado por ETHERIDGE e DE QUEIROZ (1988) que encontraram forte apoio para o monofiletismo de 8 grupos supragenéricos dentro da família, mas as relações entre e dentro destes não puderam ser estabelecidas: morunasauróides, anolóides, tropiduríneos, crotaphytíneos, sceloporíneos, iguaníneos, basiliscíneos e opluríneos.

FROST e ETHERIDGE (1989), não havendo encontrado suporte com base em caracteres morfológicos, sugeriram o desmembramento de Iguanidae em oito novas famílias: Corytophanidae, Crotaphytidae, Hoplocercidae, Iguanidae, Opluridae, Phrynosomatidae, Polychrotidae e Tropiduridae (com três subfamílias: Leiocephalinae, Liolaeminae e Tropidurinae). Autores como LAZELL (1992), criticaram essa classificação proposta por FROST e ETHERIDGE (1989). MACEY e col. (1997a), contrariamente, demonstraram forte apoio para o monofiletismo de Iguanidae, a partir de dados morfológicos e moleculares, e recomendaram que essas 8 famílias voltassem a ser reconhecidas como subfamílias. Outros autores, utilizando seqüências de DNA mitocondrial, nuclear e caracteres morfológicos corroboraram o monofiletismo de Iguanidae (SCHULTE e col., 1998; HARRIS e col., 2001). Em 2001a, FROST e col., utilizando dados morfológicos e moleculares, propuseram uma reclassificação para Iguania. Segundo os autores, Iguania englobaria dois grandes grupos: **Acrodonta**, formado por Agamidae e Chamaeleonidae e **Pleurodonta** (Iguanidae sensu BOULENGER, 1885; citada por ESTES e col., 1988), contendo as famílias Corytophanidae, Crotaphytidae, Hoplocercidae, Iguanidae, Leiocephalidae (Leiocephalinae de FROST e ETHERIDGE, 1989), Liolaemidae (Liolaeminae de FROST e ETHERIDGE, 1989), Tropiduridae (Tropidurinae de FROST e ETHERIDGE, 1989), Opluridae, Phrynosomatidae,

Polychrotidae e Leiosauridae (nova, formada por gêneros antes pertencentes a Polychrotidae). Como se pode observar na classificação supracitada, os autores constataram que a família Tropiduridae, proposta por FROST e ETHERIDGE (1989), não é monofilética, elevando as subfamílias Leiocephalinae, Liolaeminae e Tropidurinae ao status de famílias. A família Polychrotidae também não foi recuperada como monofilética e, conseqüentemente, seus gêneros divididos em duas famílias: Polychrotidae, formada apenas por *Anolis* e *Polychrus* e **Leiosauridae**, contendo *Leiosaurus*, *Diplolaemus*, *Pristidactylus*, *Enyalius*, *Anisolepis* e *Urostrophus*. (Tabela 2; Figura 3).

Tabela 2. Taxonomia proposta por FROST e col. (2001a), com base em caracteres morfológicos e moleculares.

Iguania

Acrodonta

Agamidae

Chamaeleonidae

Pleurodonta (Iguanidae sensu BOULENGER, 1885)

Corytophanidae

Crotaphytidae

Hoplocercidae

Iguanidae

Leiocephalidae (Leiocephalinae de FROST e ETHERIDGE, 1989)

Leiosauridae (nova)

Liolaemidae (Liolaeminae de FROST e ETHERIDGE, 1989)

Opluridae

Phrynosomatidae

Polychrotidae

Tropiduridae (Tropidurinae de FROST e ETHERIDGE, 1989)

Figura 3. Árvore de consenso estrito estimada por máxima parcimônia a partir de dados morfológicos e moleculares publicada por FROST e col. (2001a). Os números acima dos ramos são os valores de suporte de Bremer.

SCHULTE e col. (2003), com base em seqüências de 1838pb do DNA mitocondrial e 67 caracteres morfológicos, encontraram suporte estatístico para o monofiletismo de Corytophaninae, Crotaphytinae, Hoplocercinae, Iguaninae, Oplurinae e Phrynosomatinae (Figura 4). Entretanto para Polychrotinae e Tropidurinae o monofiletismo não foi apoiado, como já evidenciado por FROST e col. (2001a).

Figura 4. Filogenia de Iguanidae com base em dados moleculares (SCHULTE e col., 2003). Os números acima e abaixo dos ramos referem-se aos valores de *bootstrap* e índice de Bremer, respectivamente.

Como é possível perceber, a taxonomia dos lagartos Iguania já passou por numerosas revisões. A maioria dos trabalhos não utiliza a classificação proposta por FROST e col. (2001a), e continua a considerar as famílias propostas por estes autores como subfamílias de Iguanidae. No presente trabalho, adota-se a classificação proposta em 2001a por FROST e col., devido à grande quantidade de caracteres e táxons por eles estudados. Segundo esta classificação, o gênero *Enyalius* pertence a infraordem Iguania (Pleurodonta), família Leiosauridae (Figura 3).

Com relação a Leiosauridae, alguns estudos foram feitos para estabelecer as relações filogenéticas entre os seus gêneros (ETHERIDGE e DE QUEIROZ, 1988; FROST e

ETHERIDGE, 1989; FROST e col., 2001a, SCHULTE e col., 2003). O trabalho que contempla uma amostra maior de exemplares de *Enyalius* é o de FROST e col. (2001), onde o clado *Urostrophus* + *Anisolepis* aparece como grupo irmão do gênero *Enyalius* (Figura 3). Em todos esses estudos os autores chamam a atenção para a necessidade de se aumentar o número de táxons e de dados para que se possa entender melhor as relações dentro e entre os gêneros.

A família Leiosauridae está composta por seis gêneros: *Leiosaurus*, *Diplolaemus*, *Pristidactylus*, *Enyalius*, *Anisolepis* e *Urostrophus*. Todos estão distribuídos na América do Sul. Os gêneros *Pristidactylus*, *Leiosaurus* e *Diplolaemus* são predominantemente terrestres, enquanto os outros são arborícolas (CEI 1993).

Leiosaurus tem duas espécies que ocorrem do oeste da Argentina central, de Catamarca até Rio Negro. As três espécies de *Diplolaemus* são encontradas desde Mendoza até o sul de Santa Cruz na Argentina e no leste adjacente do Chile. *Pristidactylus* contém oito espécies. Sete ocorrem do oeste central do Chile em relictos das Florestas de *Nothofagus* e de Araucária, e uma forma disjunta no oeste e centro da Argentina.

Anisolepis contém três espécies: *A. grilli* ocorre no leste da Floresta Atlântica, em regiões de plantação do estado de São Paulo e no estado de Misiones, Argentina; *A. undulatus* ocorre no extremo sudeste do Brasil, Uruguai e na costa sul do Río de La Plata, Argentina; *A. longicauda* ocorre no Paraguai e na Argentina, próximo aos bancos de areia do Rio Paraguai e no estado de Misiones, onde é simpátrida com *A. grilli* (ETHERIDGE e WILLIAMS, 1991). Duas espécies de *Urostrophus* são reconhecidas: *U. vautieri*, que ocorre na Floresta Atlântica no sudeste do Brasil; *U. gallardoi*, no estado de Misiones e região do Chaco, Argentina, e no sudeste da Bolívia (ETHERIDGE e WILLIAMS, 1991).

Enyalius é um gênero arborícola que apresenta uma ampla distribuição ao longo da Floresta Atlântica, com a ocorrência disjunta de uma espécie (*E. leechii*) na Amazônia. Existem, ainda, algumas populações localizadas em enclaves isolados de Floresta na Caatinga, populações na Serra das Confusões (PI) que tem como vegetação a caatinga, e em matas de galeria no Cerrado.

Este gênero foi pela primeira vez revisado por BOULENGER (1885). Somente em 1969 uma segunda revisão foi elaborada por ETHERIDGE, envolvendo morfologia externa, distribuição geográfica e sistemática. A maioria dos exemplares estava em museus europeus e apresentava a determinação da localidade imprecisa ou muito geral, o que impossibilitou a determinação exata da distribuição geográfica do gênero (Tabela 3). Ele reconheceu oito espécies, uma delas descrita pela primeira vez, e apresentou uma chave de identificação para as mesmas.

Tabela 3. Determinação e distribuição das espécies de *Enyalius* segundo ETHERIDGE, 1969.

Espécies de <i>Enyalius</i>	Distribuição
<i>E. bibroni</i>	Localidade não especificada na Bahia e em Linhares, Espírito Santo.
<i>E. bilineatus</i>	Espírito Santo e leste adjacente de Minas Gerais.
<i>E. boulengeri</i> sp nova	Espírito Santo e sudeste adjacente de Minas Gerais. Dois exemplares com localidade da Guiana Francesa, registro duvidoso.
<i>E. brasiliensis</i>	Sudeste do Brasil e nordeste do Uruguai, de Montevideu ao Rio de Janeiro.
<i>E. catenatus</i>	Leste do Brasil, desde o estado de Pernambuco até Santa Catarina. Um registro em localidade não determinada de Goiás e um registro questionável em Buenos Aires, Argentina. Aparentemente, a distribuição desta espécie se sobrepõe a todas as outras, exceto com <i>E. leechii</i> .
<i>E. iheringii</i>	Sudeste do Brasil, do norte do Rio Grande do Sul ao norte de São Paulo.
<i>E. leechii</i>	Santarém, estado do Pará.
<i>E. pictus</i>	Extremo sudeste da Bahia

Quase uma década depois, JACKSON (1978) estudou o gênero (excetuando a espécie *E. leechii*), utilizando também dados morfológicos, inclusive padrão de cores e caracteres osteológicos. O autor delimitou as principais unidades taxonômicas existentes no leste do Brasil, propôs uma filogenia com base na afinidade fenética, e uma seqüência alopátrida de diferenciação no gênero, na qual a diferenciação observada entre as espécies estaria relacionada aos antigos refúgios de floresta separados por corredores de vegetação aberta. Existem evidências geológicas e biológicas para se acreditar que durante os períodos de clima seco do Pleistoceno (Quaternário) a Floresta Amazônica teria, em parte, sido substituída por formações abertas, ficando restrita a refúgios úmidos isolados (VANZOLINI e WILLIAMS, 1970). Para a Floresta Atlântica também há evidência geológica da existência desses ciclos climáticos durante o Pleistoceno (BIGARELLA, 1971) e um dos propósitos de JACKSON (1978) era justamente encontrar evidências biológicas que apoiassem esses achados geológicos. O autor escolheu *Enyalius* argumentando que este continha espécies ecologicamente restritas a floresta (com exceção de *E. bilineatus*), de extensa distribuição e com uma quantidade abundante de caracteres. Em 1972, VANZOLINI já havia sugerido que a diferenciação no gênero poderia estar relacionada às flutuações climáticas do Pleistoceno.

JACKSON (1978) estudou exemplares coletados ao longo da Floresta Atlântica e em algumas localidades mais interiorizadas, cujas localidades estavam bem estabelecidas, mas também utilizou exemplares com localidade incompleta. O próprio autor considerou o tamanho da amostra e a área geográfica amostrada insuficientes, principalmente no nordeste. A baixa densidade populacional das espécies de *Enyalius* (exceto *E. bilineatus*) foi apontada como uma das causas do tamanho pequeno da amostra. *E. bilineatus* foi tratado como um táxon bem definido e relativamente divergente do restante do gênero, por esse motivo sua variação geográfica foi analisada separadamente. As demais espécies foram tratadas conjuntamente. Nestas, o autor observou variação geográfica com relação a vários caracteres. Ele chama a atenção em especial para o Rio Doce que marca uma quebra na distribuição dos estados de caracteres. A partir desse estudo, o autor definiu sete entidades fenéticas acima do nível de população, além de *E. bilineatus*. Seis destas são aparentemente alopátridas e uma delas é sintópica com outras duas (Tabela 4; Figura 5).

Tabela 4. Taxonomia e correspondente distribuição geográfica das espécies de *Enyalius*, segundo JACKSON, 1978.

Espécies de <i>Enyalius</i>	Distribuição
<i>E. bilineatus</i>	Sudeste de Minas Gerais, oeste do Rio de Janeiro e oeste-central do Espírito Santo
<i>E. brasiliensis</i>	Itaiaia e Ilha Grande (RJ) para o nordeste até o lado sul do Rio Doce (ES). Populações isoladas em Goiás e Santa Catarina
<i>E.b. brasiliensis</i> <i>E. b. boulengeri</i>	Estado do Rio de Janeiro. Populações isoladas em Goiás e Santa Catarina Montanhas do sudeste do Espírito Santo.
<i>E. catenatus</i>	Nordeste do Espírito Santo a norte de Pernambuco. Populações isoladas no nordeste de Minas Gerais, centro de Goiás e no interior da Bahia e Pernambuco.
<i>E .c. bibroni</i>	Duas localidades somente: Montezuma (MG) e Garanhuns (PE). Forma encontrada em refúgios de Floresta no interior árido do nordeste.
<i>E .c. catenatus</i>	Pernambuco em direção ao sul da Bahia, próximo de Ilhéus
<i>E .c. pictus</i>	Nordeste do Espírito Santo até o extremo sul da Bahia. Obs: <i>E. c. pictus</i> e <i>E. c. catenatus</i> se sobrepõe em uma ampla região centrada em Ilhéus (BA)
<i>E. iheringii</i>	Extremo sudeste da Floresta Atlântica, Rio Grande do Sul, para o norte até Rio de Janeiro. Interior do Paraná e São Paulo. Também encontrada nas Ilhas de São Sebastião, Búzios e Vitória longe da costa nordeste de São Paulo.
<i>E. perditus</i> sp nova	De Macaé, Rio de Janeiro até sudoeste de São Paulo.

As três filogenias propostas por JACKSON (1978), baseadas respectivamente em dados morfométricos merísticos, osteológicos (crânio) e no padrão de cores, apresentaram resultados similares. O autor escolheu *E. b. brasiliensis* como ancestral hipotético para o cálculo das árvores de Wagner. Dois grupos relativamente distintos são identificados: um deles **basal** composto por *E. b. brasiliensis*, *E. perditus*, *E. b. boulengeri* e *E. iheringii*, e outro **derivado** formado por *E. c. catenatus*, *E. c. pictus*, *E. c. bibroni* e *E. bilineatus* (Figura 5). Dentro desse último grupo, *E. bilineatus* e *E. c. bibroni* são mais derivados que *E. c. pictus*. A filogenia baseada em caracteres morfométricos difere das demais por apresentar *E. bilineatus* no grupo basal. Apesar do autor não ter incluído *E. leechii* na análise, segundo os dados obtidos de dois exemplares, ele acredita que esta espécie é mais relacionada a *E. brasiliensis*. O autor ainda chama a atenção para o fato de que a presença de uma forma vicariante na

Amazônia apóia a sugestão que *E. brasiliensis* está relacionada ao estoque basal de *Enyalius* na Floresta Atlântica. Com exceção de *E. bilineatus* que já foi encontrada em capoeira suja e em plantações de café, as demais espécies estão restritas a florestas. Estes dados mostram que os *Enyalius* da Floresta Atlântica, excluindo *E. bilineatus*, tem nichos similares. Tal similaridade parece indicar que a distribuição amplamente alopátrida resultou da inabilidade em dividir nichos e também sugere que a diferenciação não foi “conduzida” pela adaptação a novos nichos e sim, preferivelmente, devido à interrupção do fluxo gênico.

E. iheringii e *E. perditus* são o único par de espécies sintópicas (Parati, Cubatão, Paranapiacaba, cidade de São Paulo, Boracéia, Ubatuba e ilha de São Sebastião).

Na interpretação dos dados, JACKSON (1978) diz que *E. bilineatus* é, provavelmente derivado de *E. c. bibroni* ou *E. c. pictus*. Um ancestral similar a *E. b. brasiliensis* foi o táxon ancestral do gênero, que colonizou as Florestas Amazônica e Atlântica antes destas serem separadas por vegetação aberta. Um evento de especiação deu origem a *E. leechii* na Amazônia. O ancestral similar a *E. b. brasiliensis* logo se dispersou pela Floresta Atlântica, sendo geograficamente homogêneo. O primeiro período seco poderia ter isolado várias porções dessa extensa população. Por problemas fisiológicos e de competição, *Enyalius* não poderia permanecer nessas regiões áridas. Uma das populações isolada do refúgio de São Paulo, Bocaína ou da Serra dos Órgãos deu origem a *E. perditus*. O mesmo período seco ou outro teria interrompido o fluxo gênico entre a população do refúgio de Santa Catarina e aqueles mais ao norte, originando neste refúgio *E. iheringii*. Por uma série de fatores o autor hipotetizou que *E. iheringii* originou-se de *E. b. brasiliensis* em vez do ancestral deste. Quando novamente a floresta úmida se expandiu para o norte do refúgio de Santa Catarina, *E. iheringii* se deslocou até o leste de São Paulo. A expansão em direção ao norte tornou *E. iheringii* simpátrida a *E. perditus* no extremo leste de São Paulo. *E. perditus*, por sua vez, se expandiu em direção ao nordeste, tornando-se simpátrida a *E. b. brasiliensis*. Durante um episódio de seca, a porção norte da distribuição de *E. b. brasiliensis* ficou isolada por um corredor seco ao longo do Rio Paraíba. Em um refúgio ao norte dessa barreira, *E. b. boulengeri* derivou de um estoque do ancestral semelhante a *E. b. brasiliensis*. Após um novo contato entre os refúgios, *boulengeri* se espalhou de seu ponto de origem e competitivamente substituiu o ancestral semelhante a *brasiliensis* no norte do Rio Paraíba. O próximo período seco isolou populações de *boulengeri*, uma delas ao norte do refúgio do Espírito Santo que deu origem a *E. c. catenatus*. Na época úmida seguinte, esta população aumentou sua área em direção ao norte do Rio Doce. As duas subespécies costeiras de *E. catenatus* teriam se diferenciado durante um ou mais períodos secos, nos quais a população costeira teria sido fragmentada nos refúgios de Espírito Santo, Salvador e Pernambuco. A forma isolada no

Espírito Santo deu origem a *E. c. pictus*. Quando novamente a floresta se expandiu para o nordeste, uma zona de contato se estabeleceu entre *E. c. catenatus* e *E. c. pictus* próxima do Rio Jequitinhonha e se expandiu em direção ao oeste (Goiás). *E. c. bibroni* teria derivado de *E. c. pictus*, em adaptação as florestas semidecíduas do interior do nordeste. Acredita-se que essa diferenciação teria sido ocasionada mais por isolamento ecológico que geográfico. Durante o período de chuvas *E. c. bibroni* tornou-se distribuída nas Florestas semidecíduas do interior, de Minas Gerais a Pernambuco, bem provavelmente ao longo das matas de galeria do Rio São Francisco. Quando o clima mudou, *E. c. bibroni* ficou restrita a enclaves de floresta no interior do nordeste. Um desses enclaves em Minas Gerais, acima do refugio do Rio Doce, ocupado por *E. c. bibroni*, foi se tornando, gradativamente, mais seco e aberto favorecendo a seleção de uma forma de locomoção mais rápida de *Enyalius*, *E. bilineatus*.

Figura 5. Reprodução da árvore de Wagner publicada por JACKSON (1978) mostrando as relações entre as espécies de *Enyalius* do leste do Brasil, com base em caracteres do crânio. O autor utilizou o táxon *E. b. brasiliensis* como ancestral.

Esta revisão de JACKSON (1978) foi a última realizada no gênero. Portanto, até o momento, o gênero *Enyalius* engloba seis espécies, duas delas politípicas: *E. bilineatus*, *E.*

brasiliensis (*E. b. boulengeri* e *E. b. brasiliensis*), *E. catenatus* (*E. c. catenatus*, *E. c. bibroni* e *E. c. pictus*), *E. iheringii*, *E. leechii* e *E. perditus*. Exceto por *E. leechii*, que ocorre na Floresta Amazônica, as demais estão distribuídas ao longo da Floresta Atlântica. Populações isoladas de *E. bilineatus* são encontradas nas matas de galeria nos cerrados do Brasil central, e de *E. c. bibroni* (tratada no presente estudo como *E. bibroni*) em enclaves de Floresta na Caatinga. Ecologicamente, *E. bilineatus* é bem diferente das demais espécies e tem várias adaptações morfológicas ao habitat aberto, tal como redução do número de escamas dorsais e cauda longa, que permite o comportamento de fuga bípede.

Não existem estudos filogenéticos com utilização de dados moleculares ou citogenéticos que tenham estabelecido as relações de parentesco entre as espécies deste gênero. FROST e col. (2001a) em seu estudo da família Iguanidae (sensu ESTES e col., 1988), obtiveram sequências de alguns poucos exemplares de *Enyalius*, não obtendo uma resolução para as relações de parentesco dentro do gênero (Figura 3). Esses autores chamaram a atenção para a necessidade de estudos mais abrangentes, incluindo mais localidades e exemplares, sugerindo que esse número de seis espécies proposto por JACKSON (1978) estaria subestimado.

1.2. CITOGENÉTICA

Num olhar superficial, os dados citogenéticos parecem meramente descritivos. No entanto, estudos cromossômicos permitem que se detectem polimorfismos e heteromorfismos envolvendo tanto autossomos quanto cromossomos sexuais, mecanismos cromossômicos de determinação do sexo, ocorrência de poliploidia e cromossomos supernumerários e, em alguns casos, caracteres citogenéticos que sirvam para diagnosticar espécies (cariótipos espécie-específicos). Variação cromossômica nos mais diversos níveis permite a comparação de espécies, estabelecimento de homeologias e a compreensão dos rearranjos cromossômicos que originam os diferentes cariótipos.

Essas informações citogenéticas são importantes para a compreensão dos mecanismos envolvidos na evolução cromossômica, sendo que o papel das alterações cariotípicas no processo da especiação continua a ser um assunto polêmico. De acordo com WHITE (1978), os rearranjos cromossômicos podem ter desempenhado uma função direta na especiação de vários grupos de animais. Outros autores, como BICKHAM e BAKER (1979), contestam esta visão e consideram que, em muitos casos, essa variação cromossômica tem um papel meramente adaptativo durante o processo da evolução e que não existem evidências

convincentes de que a diferenciação cromossômica facilite significativamente a divergência genética ou a especiação. JOHN (1981) sugere que, entre os diferentes modos de especiação, alguns envolveriam mudanças cromossômicas. KING (1993) discute o papel dos diferentes rearranjos cromossômicos no processo de especiação, salientando a importância de parâmetros como estrutura social, vagilidade e tamanho populacional para uma melhor compreensão das relações entre mudança cromossômica e especiação. Este autor chama a atenção para o papel do sistema meiótico do organismo, o qual efetivamente irá definir se um rearranjo específico poderá ou não estar envolvido no processo de especiação, isto é, um rearranjo estrutural poderá segregar de forma balanceada em um determinado organismo e não em outro, sendo que esse evento decidirá a relevância do rearranjo na especiação. Também analisa vários modelos de especiação cromossômica, nos quais, em sua totalidade, as mudanças cromossômicas têm papel primordial na especiação. Os dados citogenéticos são uma ferramenta importante não só para a caracterização das espécies, mas também para o entendimento dos processos evolutivos que ocorrem nos diferentes grupos.

Estudos citogenéticos envolvem desde a simples descrição do número e morfologia dos cromossomos até análises detalhadas da estrutura e organização, revelada através das várias técnicas de coloração diferencial: marcação das regiões organizadoras de nucléolos com nitrato de prata (Ag-RONs); tratamento com hidróxido de bário e tripsina para obtenção de bandas CBG (evidenciam heterocromatina constitutiva) e GBG (bandas claras e escuras ao longo dos cromossomos), respectivamente; incorporação *in vivo* ou *in vitro* de 5-bromodeoxiuridina para gerar o padrão de bandas RBG, que é reverso ao padrão de bandas GBG; hibridação *in situ* (FISH) com sondas teloméricas ou ribossômicas; pintura cromossômica, que permite que cromossomos de diferentes espécies sejam comparados através das homeologias de DNA (ZOOFISH).

Embora diferenças nos cariótipos estejam correlacionadas com diferenciação taxonômica, o papel das mudanças cromossômicas na especiação é um assunto controverso (SITES e MORITZ, 1987; KING, 1993). Alguns organismos, não mostram nenhuma variação interespecífica nos cariótipos a despeito, por exemplo, de mudanças na morfologia. Outro ponto bastante discutido na literatura diz respeito à existência de tendências na evolução cariotípica. Este argumento é baseado em correlações do padrão cariotípico com dados morfológicos. Hipóteses deste tipo podem ser testadas dentro de um contexto filogenético.

Poucos são os trabalhos utilizando dados citogenéticos para análises filogenéticas. Este conjunto de informações é independente de outros dados como morfologia, ecologia, bioquímica. Dados cromossômicos podem revelar diferenças que não são detectadas a partir de outros dados.

É difícil se discutir a respeito da direção das mudanças evolutivas sem um uso apropriado das informações citogenéticas uma vez que as análises filogenéticas necessitam de um bom entendimento da estrutura e função dos cromossomos. Uma das limitações do uso dos dados citogenéticos é a identificação dos cromossomos e o estabelecimento de homeologias, principalmente em anfíbios e répteis nos quais a obtenção dos padrões longitudinais de bandas é dificultada pela não obtenção das bandas GBG e necessidade, geralmente, de células em cultura para a obtenção do padrão de bandas RBG.

Existem alguns artigos que apresentam discussões a respeito da utilização das informações cariotípicas na realização de inferências filogenéticas e do papel das mudanças cromossômicas nos processos de especiação (SITES e MORITZ, 1987; KLUGE, 1994; KING, 1994; SITES e REED, 1994). DOBIGNY e col. (2004) em um artigo bem interessante de revisão, discutem sobre a utilização de dados citogenéticos para investigações filogenéticas e apontam as vantagens e desvantagens destes nas reconstruções das relações de parentesco. Alguns estudos filogenéticos, populacionais e de delimitação de espécies foram feitos em lagartos usando dados cromossômicos aliados a dados morfológicos e de sequência de genes nucleares e mitocondriais (FLORES-VILLELA e col., 2000; BOSCH e col., 2003; PELLEGRINO e col., 2005), revelando que o cariótipo é mais uma valiosa informação que pode contribuir para a resolução de questões taxonômicas e filogenéticas.

CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE OS ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM LAGARTOS

As análises citogenéticas em lagartos foram, durante um longo tempo, de difícil realização. Não se conseguiam preparações cromossômicas com boa resolução morfológica, principalmente quando os cromossomos tinham tamanho muito reduzido. As técnicas de coloração diferencial, comumente empregadas em cromossomos de mamíferos, raramente eram bem sucedidas em répteis.

A década de 80 iniciou uma nova etapa no estudo citogenético dos lagartos, mostrando um salto qualitativo nas análises cromossômicas, com trabalhos apresentando cromossomos com boa definição morfológica e submetidos a diferentes técnicas de coloração diferencial para o estabelecimento do padrão de bandas CBG, RBG e marcação das regiões organizadoras de nucléolos com nitrato de prata (RONs). Mais recentemente, experimentos de hibridação *in situ* com sondas ribossômicas (PORTER e col., 1991, 1994) e teloméricas (MEYNE e col., 1990; SCHIMD e col., 1994; PELLEGRINO e col., 1999a; BERTOLOTTO

e col., 2001) têm sido publicados. No entanto, estes trabalhos estão restritos a poucas espécies.

No Brasil, a citogenética de lagartos teve início na década de 60 com a produção de trabalhos restritos à descrição dos cariótipos em coloração convencional, abrangendo espécies pertencentes a várias famílias (BEÇAK e col., 1972; PECCININI 1970; PECCININI e col., 1971; PECCININI-SEALE e FROTA PESSOA, 1974; CÓLUS e FERRARI, 1988). Por volta da metade da década de 80, publicações com padrões de bandamento em cariótipos de lagartos começam a surgir no país. As espécies mais investigadas têm sido aquelas das famílias Tropiduridae, Teiidae, Gekkonidae e Gymnophthalmidae (YONENAGA-YASSUDA e col., 1995, 1996; 2005; YONENAGA-YASSUDA e RODRIGUES, 1999; PELLEGRINO e col., 1999a,b, 2001, 2003; SANTOS e col., 2003).

A começar pelo cariótipo em coloração convencional, a amplitude de variação do número diplóide em lagartos se estende de $2n=16$, detectada em *Gonatodes taniae* (Gekkonidae) (SCHMID e col., 1994), a $2n=64$, visto em *Nothobachia ablephara* (Gymnophthalmidae; PELLEGRINO e col., 1999 b). Dois tipos gerais de cariótipos são encontrados: (a) composto de cromossomos com uma distinção clara de tamanho, chamados de macrocromossomos e microcromossomos; (b) composto por cromossomos que apresentam variação gradual de tamanho (Figura 6).

Figura 6. Exemplos dos tipos gerais de cariótipos encontrados em lagartos. (a) *Enyalius bilineatus* ($2n=36$, 12M+24m), com 12 macro e 24 microcromossomos (BERTOLOTTO e col., 2002); (b) *Gonatodes humeralis* ($2n=32$), com variação gradual dos cromossomos (SANTOS e col., 2003).

O padrão de bandas CBG, que evidencia regiões de heterocromatina constitutiva, e a marcação das regiões organizadoras de nucléolos (RONs) com nitrato de prata são as técnicas empregadas com maior êxito neste grupo de vertebrados (Figura 7a e b). No caso das bandas RBG, que revela um padrão longitudinal de bandas claras e escuras ao longo dos cromossomos, são poucos os trabalhos que o descrevem em espécies de lagartos (Figura 7c).

O padrão de bandas GBG, por motivos desconhecidos, é de difícil obtenção neste grupo de vertebrados.

Figura 7. Coloração diferencial em lagartos. (a) RONS em *Enyalius leechii* (presente trabalho); (b) padrão de bandas CBG em *Procellosaurinus erythrocerus* (YONENAGA-YASSUDA e col., 1996); (c) padrão de bandas RBG em *Leposoma scincoides* (PELLEGRINO e col., 1999a).

Com relação à determinação do sexo, esta pode ser genotípica ou ambiental nos répteis. Várias espécies que possuem determinação sexual genotípica apresentam cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados. As considerações teóricas, assim como os estudos realizados no grupo, indicam que espécies com mecanismo de determinação sexual ambiental não possuem cromossomos sexuais e que espécies com cromossomos sexuais não apresentam mecanismo de determinação sexual ambiental (BULL 1980). Entretanto, em certas condições, os dois sistemas não devem ser mutuamente exclusivos. Em geral, porém, quando cromossomos sexuais são encontrados, a determinação sexual genotípica pode ser assumida, mas o fato destes não serem encontrados não implica necessariamente que se trate de um mecanismo de determinação ambiental. É interessante mencionar que a presença de cromossomos sexuais heteromórficos não somente indica que o sexo é heterogamético, mas também a parte do genoma que carrega os genes envolvidos na determinação sexual e o grau de diferenciação entre o X e o Y (ou entre o Z e o W). Quando os dados de cromossomos sexuais de espécies aparentadas são comparados, inferências podem ser feitas a respeito da história evolutiva do mecanismo de determinação do sexo (BULL, 1980).

Estudos citogenéticos em lagartos mostram que muitas espécies são desprovidas de cromossomos sexuais heteromórficos, sendo os cariótipos de machos iguais aos das fêmeas. Um fator que muitas vezes dificulta a detecção dos cromossomos sexuais é o fato desses serem microcromossomos.

Dois tipos de mecanismo cromossômico de determinação do sexo estão presentes nos lagartos: macho heterogamético, XX:XY (Figura 8a) e fêmea heterogamética, ZZ:ZW (Figura 8b). Como consequência de translocação entre cromossomos sexuais e autossomos, surgem os sistemas múltiplos de determinação do sexo, como $X_1X_1X_2X_2:X_1X_2Y$ e $Z_1Z_1Z_2Z_2:Z_1Z_2W$ (Figura 8c).

Figura 8. Mecanismos de determinação do sexo em lagartos. (a) XX:XY em *Enyalius bilineatus*, 2n=36 (BERTOLOTTO e col., 2002); (b) ZZ:ZW em *Phyllodactylus marmoratus*, 2n=40 (KING e col., 1976); (c) $X_1X_1X_2X_2:X_1X_2Y$ em *Polychrus acutirostris*, 2n=19 e 20 (BERTOLOTTO e col., 2001). Os quadrados contêm os cromossomos sexuais do macho e da fêmea em azul e vermelho, respectivamente.

Geralmente, nos iguania não-acrodontes (pleurodontes) e nas famílias Lacertidae, Teiidae, Scincidae e Pygopodidae ocorre heterogametia de macho, enquanto que a heterogametia de fêmea é observada nas famílias Gekkonidae, Lacertidae e Varanidae (COLE e col., 1969; KING e ROFE, 1976; CHEVALIER e col., 1979; KING e col., 1982; PECCININI-SEALE, 1981; SOLLEDER e SCHMID, 1984; OLMO, 1986; OTA e col., 1992; BERTOLOTTO e col., 2001, 2002).

Acredita-se que, entre os lagartos, os cromossomos sexuais podem ter surgido numerosas vezes e, provavelmente, todos apresentam uma origem relativamente recente (BICKHAM, 1984).

DAWLEY e BOGART (1989) apresentam, além de uma listagem dos répteis unissexuais, vários dados sobre a ocorrência de lagartos unissexuais, principalmente nas

famílias Teiidae e Gekkonidae, envolvendo diversos aspectos tais como ecologia, relações de parentesco, distribuição, diversidade, possíveis origens e descrições dos cariótipos. Relatam também dados citogenéticos de populações bissexuais e unissexuais de *Cnemidophorus* provenientes da Amazônia.

Cromossomos supernumerários foram encontrados em 15 espécies de lagartos de diferentes famílias (para revisão veja BERTOLOTTO e col., 2004). Estes cromossomos, também chamados de B, existem em adição ao complemento normal do indivíduo e apresentam várias peculiaridades: herança não-mendeliana, que favorece a variabilidade numérica inter e intra-individual; perda de atividade gênica, com algumas exceções em pequenos roedores e anfíbios, nos quais os cistrons ribossomais estão nos Bs (YONENAGA-YASSUDA e col., 1992; SCHMID e col., 2002, respectivamente); formam univalentes, bivalentes e multivalentes em meiose e, raramente, emparelham com cromossomos do complemento normal; geralmente são heterocromáticos após bandamento CBG e de replicação tardia (Figura 9).

Figura 9. Cromossomo B em *Enyalius bilineatus*, $2n=37/38$ (BERTOLOTTO e col., 2002 (a) Cariótipo em coloração convencional; (b) metáfase após bandamento R). Note cromossomo B de replicação tardia (seta).

Poliploidia também ocorre em lagartos, geralmente triploidia (PELLEGRINO e col., 2003), cuja origem e manutenção estão relacionadas à ocorrência de espécies partenogênicas (Figura 10).

Figura 10. Cariótipo triplóide de um exemplar de *Leposoma percarinatum*, $3n=66$ (PELLEGRINO e col., 2003)

Na literatura existem algumas revisões sobre dados cromossômicos de Reptilia (GORMAN, 1973; PECCININI-SEALE, 1981; KING, 1981; BICKHAM, 1984; OLMO, 1986). Das cerca de 4100 espécies conhecidas de lagartos, somente cerca de 20% foram cromossomicamente estudadas, com a maioria das publicações apresentando apenas a descrição dos cariótipos em coloração convencional.

Apesar de muitos lagartos serem desconhecidos cromossomicamente, vários aspectos citogenéticos interessantes, tais como cariótipos espécie-específicos, polimorfismos, heteromorfismos de cromossomos autossômicos e sexuais, ocorrência de supernumerários e poliploidia, cariótipos conservados em coloração convencional, mas distintos em coloração diferencial, variabilidade inter e intraspecífica na quantidade e distribuição da heterocromatina constitutiva e na localização e número das RONS, presença de regiões teloméricas intersticiais após hibridação *in situ* com sondas teloméricas encontram-se exemplificados nos lagartos (MORITZ, 1984, 1986; CAPULA e col., 1989; CARDONE e col., 1990; OLMO e col., 1990; KING, 1990; YONENAGA-YASSUDA e col., 1995, 1996, 1999, 2005; PELLEGRINO e col., 1997, 1999ab, 2003; BERTOLOTTO e col., 1996, 2001, 2002; SANTOS e col., 2003).

❖ CARIÓTIPOS DOS IGUANIA PLEURODONTES

Grande parte dos iguania pleurodontes (Tabela 2) apresenta o cariótipo formado por macrocromossomos e microcromossomos. A fórmula cromossômica $2n=36$, com 12 macrocromossomos e 24 microcromossomos (12M+24m), está amplamente difundida e é notavelmente conservada em relação à morfologia dos macrocromossomos em várias famílias

de lagartos (Figura 6a). É considerado, por vários autores, o cariótipo ancestral para os iguania pleurodotes (BICKHAM, 1984; GORMAN e col., 1967; PAULL e col., 1976). Para a ampla distribuição deste cariótipo foram sugeridas duas principais explicações: esta configuração teria, independentemente, evoluído nos vários grupos por ser excepcionalmente estável ou seria um caráter primitivo conservado. Esta última hipótese é apoiada pela presença deste cariótipo em membros de diferentes linhagens com caracteres osteológicos primitivos. Os que se recusam a admitir a primitividade do cariótipo $2n=36$ ($12M+24m$) sugerem que os cariótipos primitivos consistem de cromossomos acrocêntricos, com a evolução cariotípica ocorrendo por processos de fusão cêntrica, apoiando-se na idéia de que a fusão cêntrica é citogeneticamente mais viável que a fissão e, portanto, mais comum. Alguns trabalhos neste grupo de lagartos mostram, contudo, ser a fissão a explicação mais plausível (WEBSTER e col., 1972; HALL e SELANDER, 1973).

Embora o cariótipo com $2n=36$ seja bastante encontrado nos iguania pleurodotes, uma análise comparativa entre as espécies revela existir uma dicotomia em relação à estrutura cariotípica: grupos com o cariótipo $2n=36$ conservado e outros com cariótipos variáveis.

Conservação cariotípica ($2n=36$, $12M+24m$) é observada em *Tropidurus*, *Basiliscus*, *Ctenosaura*, *Cyclura*, *Phrynosoma*, *Chamaeleolis*, *Chamaelinorops*, *Phenacosaurus* (PAULL e col., 1976). Em contrapartida, gêneros como *Anolis* ($2n=25$ a 48), *Sceloporus* ($2n=22$ a 46) e *Liolaemus* ($2n=30$ a 44) apresentam ampla variabilidade cromossômica. Vários cariótipos observados nestes últimos gêneros e em *Polychrus* são bastante incomuns para os iguania não-acrodotes, pois não mostram uma distinção clara entre macrocromossomos e microcromossomos, predominando a morfologia acrocêntrica. PAULL e col. (1976) os consideram como casos isolados e explicáveis por evidências morfológicas e outras que mostram terem esses *taxa* longo tempo de separação do estoque basal.

Os estudos cromossômicos nos gêneros *Liolaemus* (LAMBOROT e col., 1981; LAMBOROT e ALVAREZ-SARRET, 1989; LAMBOROT, 1991, 1998; BERTOLOTTO e col., 1996), *Anolis* (GORMAN e col., 1967, 1968; GORMAN e ATKINS, 1969), *Tropidurus* (KASAHARA e col., 1983, 1987b; 1996; YONENAGA-YASSUDA e col., 1988b; PELLEGRINO e col., 1994) e *Sceloporus* (SITES, 1983; PORTER e SITES, 1986; SITES e col., 1993; REED e col., 1995) representam grande parte das publicações envolvendo iguania não-acrodotes.

No Brasil, a família mais explorada citogeneticamente é Tropiduridae, mais precisamente o gênero *Tropidurus*. Nesta família o cariótipo conservado $2n=36$ aparece em *Tropidurus* e *Uranoscodon*.

KASAHARA e col. (1987a) observaram variações quanto à localização das RONS e o padrão de bandas C em três espécies de *Tropidurus* do grupo *nanuzae* (as espécies desse grupo foram alocadas em um gênero novo, *Eurolophosaurus* por FROST e col., 2001b), onde as fêmeas apresentam $2n=36$ e os machos $2n=35$, devido a um mecanismo sexual múltiplo do tipo $X_1X_1X_2X_2:X_1X_2Y$. O padrão de bandas RBG obtido após tratamento *in vivo* com 5-bromodeoxiuridina (5-BrdU) e 5-fluorodeoxiuridina (5-FudR) trouxe um importante avanço técnico para a citogenética de lagartos.

KASAHARA e col. (1987b), por meio dos padrões de bandas CBG, GBG, RBG e das RONS, identificaram variações geográficas em *Tropidurus hispidus* ($2n=36$) envolvendo as regiões de heterocromatina constitutiva e a localização das RONS. Detectaram também um mecanismo de determinação sexual do tipo XX:XY, no qual o Y é um cromossomo puntiforme. Um amplo estudo citogenético comparativo, realizado em 11 espécies de *Tropidurus* do grupo *torquatus*, revelou diferenças interespecíficas e algumas intra-específicas nos padrões de bandas C e nas RONS, e também a ocorrência de dois mecanismos de determinação do sexo: XX:XY e $X_1X_1X_2X_2:X_1X_2Y$ (KASAHARA e col., 1996).

YONENAGA-YASSUDA e col. (1988b) estudaram os padrões de bandamento dos cromossomos de *Tropidurus montanus* ($2n=36$) e *Tropidurus torquatus* ($2n=36$) obtidos em cultura de fibroblastos. A análise comparativa dos cromossomos prometafásicos com bandas de alta resolução, obtidas por incorporação de 5-BrdU, mostrou uma total homeologia dos macrocromossomos destas duas espécies.

RODRIGUES e col. (1989) descreveram aspectos ecológicos e cariotípicos de *Strobilurus torquatus*, $2n=36$ (12M+24m, XX:XY), com descrições do padrão de bandas C e das RONS, além da identificação de todos os pares de macrocromossomos após bandamento R.

PELLEGRINO e col. (1994) estudaram cinco espécies de *Tropidurus* e uma de *Uranoscodon*, utilizando coloração convencional e diferencial. Todas as espécies apresentaram $2n=36$ (12M+24m), porém algumas delas puderam ser distinguidas devido a diferenças na morfologia dos macrocromossomos e microcromossomos, na localização da Ag-RONS e na quantidade e distribuição da heterocromatina constitutiva.

BERTOLOTTO e col. (1996) realizaram análises cromossômicas em três espécies de *Liolaemus*, após bandamento C, R e coloração com nitrato de prata. Os resultados obtidos permitiram estabelecer cariótipos espécie-específicos para todas.

O emprego de coloração diferencial possibilitou, em alguns destes trabalhos, estabelecer diferenças entre os cariótipos que apresentavam o mesmo padrão em coloração convencional (BERTOLOTTO e col., 1996; KASAHARA e col., 1996).

Na família Leiosauridae, o número diplóide $2n=36$ ($12M+24m$) está presente na maioria das espécies citogeneticamente conhecidas. *Urostrophus vautieri* apresenta $2n=36$ ($12M+24m$), RONS no par 2 e pouca heterocromatina constitutiva (PELLEGRINO e col., 1999c), assim como as espécies de *Enyalius bilineatus*, *E. bibroni*, *E. iheringii*, *E. leechii* e *E. perditus* (BERTOLOTTO e col., 2002). *Anisolepis grilli* apresenta também $2n=36$ ($12M+24$) e RONS no par 2 (BERTOLOTTO, dados não publicados). PINNA-SENN e col. (1987) estudaram *Pristidactylus achalensis* que mostrou $2n=36$ ($12M+24m$) e RONS no par 2. Foram detectados três cariótipos devido à variação de tamanho no primeiro par de microcromossomos.

Nas espécies de iguania pleurodontes, cromossomos sexuais heteromórficos ocorrem em vários gêneros, envolvendo freqüentemente microcromossomos (GORMAN e ATKINS, 1966; GORMAN e STAMM, 1975; COLE, 1971, 1978; YONENAGA-YASSUDA e col., 1988b; PELLEGRINO e col., 1994; KASAHARA e col., 1996; BERTOLOTTO e col., 1996, 2002). Sistemas múltiplos, $X_1X_1X_2X_2:X_1X_2Y$, estão presentes em *Anolis*, *Polychrus*, *Tropidurus* e *Sceloporus*.

KASAHARA e col. (1983) estudando exemplares de *Tropidurus torquatus*, provenientes de Sorocaba (SP), Rio Claro (SP) e Grão Mongol (MG), detectaram a ocorrência de dois tipos de mecanismos de determinação do sexo: $X_1X_1X_2X_2:X_1X_2Y$ e $XX:XY$, envolvendo microcromossomos. Trata-se de duas espécies distintas, pertencendo os exemplares de Rio Claro e Sorocaba à espécie *Tropidurus itambere* ($X_1X_1X_2X_2:X_1X_2Y$) e os de Grão Mongol, à espécie *Tropidurus hispidus* ($XX:XY$). Entre outras espécies do mesmo gênero, tais como *Tropidurus nanuzae*, *Tropidurus amathites*, *Tropidurus divaricatus*, *Tropidurus hispidus* e mesmo em outros espécimes de *Tropidurus* do grupo *torquatus*, encontraram-se machos heterogaméticos (KASAHARA e col., 1987a,b; PELLEGRINO e col., 1994; KASAHARA e col., 1996).

GORMAN e STAMM (1975) estudaram os cariótipos de três espécies de *Anolis* das Antilhas: *A. blanquillanus* com $2n=36$ ($12M+24m$), sem heteromorfismo de cromossomos sexuais; *A. nubilis* e *A. monensis* com $2n=29$ nos machos e mecanismo cromossômico de determinação sexual do tipo $X_1X_1X_2X_2:X_1X_2Y$. Existem outros trabalhos descrevendo determinação cromossômica do sexo nesse gênero, envolvendo tanto microcromossomos como macrocromossomos (GORMAN e ATKINS, 1966, 1967, 1968, 1969; GORMAN e col., 1968).

Em *Polychrus marmoratus* (machos $2n=29$ e fêmeas $2n=30$) e em *P. acutirostris* (machos $2n=19$ e fêmeas $2n=20$) foi descrito um mecanismo múltiplo de determinação do sexo do tipo $X_1X_1X_2X_2:X_1X_2Y$ (GORMAN e col., 1967; BERTOLOTTO e col., 2001).

Com relação à família Leiosauridae, mecanismos de determinação sexual do tipo XX:XY, com Y puntiforme foram descritos em *Enyalius* (BERTOLOTTO e col., 2002), *Pristidactylus* (PELLEGRINO, 1993) e *Urostrophus* (PELLEGRINO e col., 1999c).

1.3. ESTUDOS MOLECULARES

Os avanços das técnicas moleculares, particularmente o desenvolvimento da reação em cadeia da polimerase-PCR (“polymerase chain reaction”) (MULLIS e col., 1986), têm permitido grandes progressos nas análises dos genomas eucariontes. O sequenciamento de ácidos nucleicos tem se desenvolvido rapidamente nas últimas décadas. Embora o sequenciamento de DNA seja uma abordagem relativamente nova para a sistemática, o mesmo tem se tornado uma das estratégias moleculares mais utilizadas para estabelecer e testar hipóteses sobre a história evolutiva dos organismos. As seqüências de DNA são usadas para estimar árvores de genes e a partir destas fazer inferências a respeito das relações de parentesco entre populações, espécies, gêneros, bem como categorias hierárquicas superiores.

O seu amplo uso está relacionado à quantidade de dados extraídos das seqüências de nucleotídeos quando comparada a outros tipos de caracteres como os morfológicos, por exemplo. Somado a esta vantagem, está o fato de ser relativamente fácil extrair e incorporar informação a respeito dos processos moleculares evolutivos nas análises. Além disso, a evolução das seqüências é relativamente mais simples de modelar e há de se considerar o grande potencial informativo desse conjunto de dados (HILLIS e col., 1996). O sequenciamento de DNA pode ser utilizado como ferramenta na obtenção de dados que auxiliam na elucidação dos processos que geram a variabilidade observada nessas moléculas, em estudos da origem de novos alelos e novos locos, na investigação de convergência e seleção. Uma aplicação importante diz respeito aos estudos populacionais ou intraespecíficos, incluindo o traçado de genealogias alélicas e de organismos dentro de espécies e estudos de variação geográfica, fluxo gênico, hibridação e genética de conservação (AVISE, 1994).

Os estudos interespecíficos, tais como a construção de filogenias de espécies para avaliar padrões e processos evolutivos são outros exemplos nos quais as seqüências moleculares podem ser empregadas (AVISE, 1994; MINDELL, 1997). Dentro dessas categorias está incluído um grande número e diversidade de aplicações específicas, tais como: análises comportamentais e ecológicas, estudos de desenvolvimento, genética de populações, aplicações sistemáticas e taxonômicas, estudos epidemiológicos, entre outros (AVISE, 1994).

❖ ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS GÊNICAS

Em princípio, o uso de sequências de DNA para as análises filogenéticas se processa a partir de um conjunto de dados, no qual os caracteres são representados pelos sítios ao longo das sequências e os estados de caráter são os nucleotídeos observados nessas posições. Os dados de sequências de nucleotídeos são geralmente tratados como caracteres multiestado não ordenados, portanto qualquer estado (A, T C ou G) pode transformar-se diretamente em outro.

Os dados a serem comparados entre as sequências são as bases presentes nos sítios homólogos, que podem ser as mesmas ou podem estar substituídas por outras. As substituições de bases podem ser de dois tipos: (1) transições, quando envolve ou bases púricas ou pirimídicas ($A \leftrightarrow G$ ou $C \leftrightarrow T$); (2) transversões, quando envolve uma base púrica e outra pirimídica ($A \leftrightarrow T$, $A \leftrightarrow C$, $G \leftrightarrow T$ e $G \leftrightarrow C$). Geralmente as transições são mais comuns que as transversões, devido ao fato de que estas últimas geram distorções de largura na molécula de DNA e a probabilidade do sistema de reparo celular “consertar” esse tipo de mutação é muito maior do que no caso de uma transição. Por esse motivo, as transições podem se acumular e ocasionar saturação em vários sítios, que passam a ser não informativos em alguns tipos de análises, como por exemplo na máxima parcimônia. Outro aspecto interessante a ser levado em conta é a heterogeneidade das taxas de evolução ao longo da molécula de DNA, como, por exemplo, a que ocorre entre a 3ª base do códon com relação às 1ª e 2ª bases que sofrem pressão seletiva mais acentuada. Portanto espera-se que a 3ª base seja a mais saturada de substituições. Existem testes que verificam a ocorrência de saturação nas sequências que se deseja comparar, como por exemplo, o desenvolvido no programa DAMBE criado por XIA e XIE (2001) que gera um gráfico plotando o número de transições e transversões *versus* a divergência entre as sequências. Se a distribuição das transições e transversões gerarem retas paralelas, considera-se que não há saturação. Entretanto, se a reta das transições se cruzar com a das transversões, a partir desse ponto se considera haver saturação.

Quando as substituições ocorrem em regiões codificadoras do genoma, elas podem ser classificadas como sinônimas (não há alteração do aminoácido na proteína resultante) ou não-sinônimas (o aminoácido muda). Também existem aquelas substituições que geram códons de parada, chamadas de mutações sem sentido. Além da substituição de bases, também denominadas “mutações pontuais”, existem mutações do tipo inserção/deleção (indels), que envolvem a adição ou remoção de nucleotídeos em uma determinada sequência de DNA. As inserções ou deleções que não envolvem múltiplos de três nucleotídeos provocam alteração

no quadro de leitura do gene, levando a produção de proteínas com baixa ou nenhuma atividade.

Além da necessidade de se usar moléculas homólogas, a análise filogenética de seqüências pressupõe homologia de posição (HILLIS e col., 1996). Isto é, nucleotídeos observados numa determinada posição no táxon em estudo traçariam sua ancestralidade em uma posição única que ocorreria no ancestral comum daqueles táxons (HILLIS e col., 1996; LI, 1997).

O termo homologia refere-se à ancestralidade comum e deve-se ter cuidado para não confundir com similaridade. Esta última diz respeito a uma observação empírica e pode ser quantificável. Duas seqüências, por exemplo, podem ser similares por diferentes razões, tais como ancestralidade comum, convergência ou conversão gênica (PATTERSON, 1988).

Além disso, existem diferentes tipos de homologia. Se a homologia entre duas seqüências pode ser associada a um evento de especiação fala-se em seqüências ortólogas. Por outro lado, se a ancestralidade em comum deve-se a um evento de duplicação gênica, são então seqüências parálogas (FITCH, 1970). Se a homologia deve-se a transferência horizontal de genes (p.ex. via retrovírus), denominam-se seqüências xenólogas (GRAY e FITCH, 1983). Somente as seqüências ortólogas podem ser utilizadas para inferir relações filogenéticas entre espécies. O uso incorreto pode resultar em estimativas corretas da filogenia das moléculas, mas incorretas quanto à filogenia dos organismos dos quais elas foram amostradas. É muito importante que o segmento amplificado seja de um locus ortólogo. Esta dificuldade é menos encontrada no DNA mitocondrial porque este não tem múltiplos loci. Entretanto cuidado deve existir para a possibilidade da ocorrência de pseudogenes, isto é, genes mitocondriais que foram transferidos para o genoma nuclear (p.ex.: roedores, SMITH e col., 1992; aves, QUINN, 1992). O uso de extrações enriquecidas de mitocôndrias é uma maneira também de minimizar essas interferências, além de outros pontos que marcam diferenças entre o DNA mitocondrial (DNAm_t) e o genômico com relação aos pseudogenes como, por exemplo a razão transição/transversão e a presença de indels ou códons de parada. Eventos de inserção/deleção devem ser levados em conta uma vez que podem atrapalhar no estabelecimento da homologia posicional dos nucleotídeos. Nesse sentido, muita atenção deve ser dada ao alinhamento das seqüências.

O alinhamento de seqüências pode ser obtido pela inserção de lacunas (“gaps”), que correspondem a inserções ou deleções (eventos indel) em uma ou mais seqüências, de modo a alcançar uma similaridade maior entre as mesmas. Este procedimento procura, desta forma, posicionar os sítios homólogos numa mesma coluna da matriz de dados. Com exceção de seqüências relativamente conservadas, eventos de inserção e/ou deleção devem ser sempre

postulados de forma a se supor que nucleotídeos em posições correspondentes nas várias seqüências são de fato homólogos (HILLIS e col., 1996; LI, 1997).

O objetivo do alinhamento é justamente fazer com que o sítio de cada base que esteja sendo comparado entre as seqüências seja homólogo. O alinhamento de seqüências de genes que codificam proteínas entre táxons relativamente próximos geralmente não mostra dificuldade. Contrariamente, o alinhamento de seqüências pertencentes a táxons distantemente relacionados ou referentes a regiões não codificantes de proteínas geralmente é uma tarefa difícil, sendo necessária a inserção de lacunas (gaps).

Existem na literatura alguns trabalhos que discutem a respeito de como as lacunas devem ser tratadas na análise filogenética, se devem ser consideradas como um 5° estado ou como dado perdido -missing data- (GIRIBET e WHEELER, 1999). Embora as lacunas sejam muitas vezes tratadas como 5° estado, os processos responsáveis por uma substituição, uma deleção ou uma inserção são bem distintos entre si. Muitos autores defendem que regiões de alinhamento que contenham um número elevado de lacunas devem ser retiradas da análise uma vez que o estabelecimento da homologia não é confiável nessas regiões.

Diversos programas de alinhamento estão disponíveis (Clustal W, Macaw, TreeAlign, entre outros). Alguns pesquisadores, entretanto, preferem o alinhamento manual, principalmente quando se trata de genes ribossomais que podem ser alinhados com base na estrutura secundária do RNAr (para uma revisão sobre alinhamentos veja PHILLIPS e col., 2000). O alinhamento das seqüências é uma das etapas cruciais do uso deste tipo de dado, talvez a mais importante. Trabalhos mostram que o uso de um alinhamento considerado confiável resulta em hipóteses filogenéticas semelhantes, independentemente do método de reconstrução utilizado.

❖ ESCOLHA DOS GENES

Outro aspecto muito importante em estudos envolvendo a análise de seqüências é a escolha da região do genoma a ser comparada. As taxas de mutação variam entre as regiões codificadoras e não-codificadoras, entre os genes e nas diferentes regiões de um mesmo gene. Quanto maiores forem as restrições funcionais, menores serão as taxas evolutivas devido ao efeito deletério. A estrutura terciária das proteínas é outro fator que pode influenciar nas taxas de substituição.

Nas regiões não-codificadoras, as taxas evolutivas são, em geral, mais elevadas, pois não existe restrição funcional. A escolha da região nucleotídica dependerá do grau de

divergência entre os táxons que se deseja estudar. A variabilidade evolutiva de qualquer molécula é o resultado das mutações em contrapartida das restrições impostas pela estrutura e função. Essa taxa de evolução é relativamente constante para algumas seqüências em diferentes grupos taxonômicos o que possibilita prever a evolução destas seqüências dentro de limites de intervalos. Com isso, é possível escolher seqüências específicas que apresentarão grau de variabilidade informativa para o problema em questão.

Deve-se ter cuidado com o mau uso do grau de divergência entre seqüências homólogas na inferência das relações filogenéticas. Se uma parte da molécula é composta de sítios altamente variáveis e saturados e outra parte com sítios invariáveis, a combinação destes será não informativa, apesar da porcentagem de divergência entre as moléculas parecer apropriada.

RUSSO e col. (1996) testaram a eficiência de genes mitocondriais e dos métodos de reconstrução filogenética, utilizando uma filogenia conhecida. Eles verificaram que a escolha do gene é muito mais importante do que a escolha do método de reconstrução para a obtenção da “filogenia correta”, mostrando que se a escolha dos genes for cuidadosa, qualquer método de reconstrução filogenética é capaz de recuperar a árvore “correta”.

Os genes podem ser do DNA mitocondrial ou do DNA nuclear. O DNAmít apresenta várias características que o tornam uma importante ferramenta para estudos evolutivos, entre elas o fato de apresentar, predominantemente, herança uniparental (materna), ausência de recombinação (todas as partes da molécula compartilham a mesma descendência), ausência de introns e altas taxas evolutivas, sendo que existe uma variação nessas taxas dependendo da região. O DNAmít é bastante utilizado para estudos de genética de populações, onde a filogenia dos genes juntamente com a biogeografia das populações permite inferências sobre a estrutura genética das populações, incluindo taxa de migração, fluxo gênico, ocorrência de redução de heterozigosidade e introgressão, entre outras informações. Com relação a estudos de diversidade interespecífica, os genes mais utilizados também são os mitocondriais. Algumas seqüências nucleares têm sido utilizadas em alguns grupos, embora a duplicação gênica e a presença de pseudogenes muitas vezes dificultem o seu uso. Além disso, a amplificação de genes nucleares de cópia única é difícil devido a pouca quantidade de DNA alvo e pela presença de introns. Os genes nucleares apresentam, geralmente, taxas mais lentas de evolução.

Outro aspecto importante na inferência de filogenias a partir de seqüências de DNA é como as seqüências devem ser amostradas. Em um único grupo de ligação, como o genoma mitocondrial, é mais apropriado obter as seqüências de trechos curtos dispersos através do

genoma a longas regiões contínuas, levando-se em conta a heterogeneidade na variabilidade e composição de bases entre as regiões (CUMMINGS e col., 1995).

Será que a árvore do gene sempre reflete a filogenia do organismo? (para uma revisão veja AVISE 1994). Particularmente para espécies com parentesco próximo, a árvore de um determinado gene pode diferir da árvore das espécies devido à retenção do polimorfismo ancestral, fluxo gênico ou eventos de hibridação (PAMILO e NEI, 1988; HEY e KLIMAN, 1993). O uso combinado de diferentes genes independentes pode minimizar esses efeitos, embora alguns autores se oponham a esse tipo de análise.

❖ GENES MITOCONDRIAIS

As mitocôndrias são organelas especializadas na produção e conservação de energia celular (GRAY e DOOLITTLE, 1982). A descoberta do DNA mitocondrial (DNAm), de replicação independente, não apenas apoiou a hipótese endossimbionte, como identificou uma fonte de informação genética de fácil isolamento e manipulação em laboratório.

Com raras exceções, o DNAm dos animais é uma molécula circular fechada covalentemente, cujo tamanho varia de 15 a 20 Kb. Suas cadeias são referidas como leve (“light chain”, L) e pesada (“heavy chain”, H) de acordo com sua densidade em gradiente de cloreto de cério. O DNAm dos vertebrados contém 37 genes que codificam: 13 proteínas envolvidas no transporte de elétrons e fosforilação oxidativa; dois RNAs ribossômicos (rRNAs 12S e 16S) e 22 RNAs transportadores (tRNAs) (Figura 11). O DNAm também contém uma ou duas regiões não codificantes de cerca de 1Kb, denominadas região controle (“control region”) ou “D-loop” (“displacement loop”) que regulam o início da duplicação e da transcrição dos genes (AVISE, 1994; GILHAN, 1994). A ordem dos genes pode variar de acordo com o grupo.

Figura 11. Genoma mitocondrial humano

(fonte: <http://www.biologia.uab.es/biocomputacio/tutorial/sessio6/mitocongenoma>).

O DNAm_t é bastante compacto, não apresentando seqüências de DNA repetitivo, pseudogenes, introns e elementos móveis na maioria das vezes. Os espaçadores intergênicos são pequenos (menores que 10pb) ou estão ausentes. Em alguns casos, os genes se sobrepõem em fases de leitura diferentes e há uma redução de uma (T) ou duas (TA) bases nos códons de terminação. Tais códons são completados pós-transcricionalmente com a adição da seqüência poli (A) na extremidade 3' do DNA (OJALA e col., 1981).

Os primeiros genomas mitocondriais de vertebrados seqüenciados completamente incluem o do camundongo (BIBB e col., 1981), do homem (ANDERSON e col., 1981; Figura 11) e do boi (ANDERSON e col., 1982). Nestes casos, além de apresentarem o mesmo conteúdo de genes, a ordem dos mesmos é igual.

Dentre as principais vantagens de se estudar o DNAm_t, destacam-se seu tamanho reduzido, a herança predominantemente materna (LANSMAN e col., 1983), a ausência de recombinação (CLAYTON, 1992; HAYASHI e col., 1985), a ausência de segregação de

alelos (AVISE, 1994) e a taxa de evolução 5-10 vezes mais rápida que a estimada para o genoma nuclear (BROWN e col., 1979; BROWN e col., 1982).

Apesar da rápida evolução do genoma mitocondrial, certas características são altamente conservadas. Essas incluem a estrutura do DNAm (BRIDGE e col., 1992), a ordem gênica, o código genético e a estrutura secundária que assumem os transcritos de rRNA e tRNA (revisado por WOLSTENHOLME, 1992). A ordem dos genes mitocondriais varia entre os filos especialmente com relação à localização das seqüências dos tRNAs. Existem algumas indicações de variações menores dentro de classes ou filos de vertebrados (PAABO e col., 1991; DESJARDINS e MORAIS, 1991; SEUTIN e col., 1994).

São descritos na literatura vários estudos onde o DNAm tem sido empregado com sucesso: abordagens filogeográficas (BERMINGHAM e AVISE, 1986, COSTA, 2003; CARNAVAL, 2002; PELLEGRINO e col., 2005), filogenéticas (MURPHY e COLLIER, 1996; MACEY e col., 1997; PELLEGRINO e col., 2001; WHITING e col. 2003; 2006; RIBAS e MIYAKI, 2004; AUSTIN e ARNOLD, 2006), de estimativas do tempo de divergência entre vários organismos (HEDGES e col., 1996; COOPER e PENNY 1997; KUMAR e HEDGES, 1998) e em estudos de evolução molecular (HILLIS e col., 1996; LI, 1997).

Vários genomas mitocondriais completos, inclusive do lagarto *Sceloporus occidentalis*, e um grande número de seqüências parciais, principalmente do citocromo b, estão disponíveis em banco de dados como o GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A partir desses dados, foi possível determinar, mais precisamente, as taxas de substituição de nucleotídeos nessas organelas. A taxa de substituições sinônimas no genoma mitocondrial de vertebrados foi estimada em $5,7 \times 10^{-8}$ / sítio / ano (BROWN e col., 1982). Esse valor é quase 10 vezes maior que o encontrado no genoma nuclear. No caso das substituições não-sinônimas, há uma grande variação entre os 13 genes que codificam proteínas, dependendo das restrições funcionais, assim como nos genes nucleares.

As altas taxas de substituição de nucleotídeos nas mitocôndrias podem ser ocasionadas por altas taxas de mutação que, por sua vez, seriam causadas pelo excesso de resíduos metabólicos, pela baixa fidelidade na replicação e pela ausência de mecanismos de reparo (LI, 1997). Os genes ribossomais 12S e 16S são mais adequados para divergências de cerca de 150 Mya ou menos (MINDELL e HONEYCUTT, 1990), enquanto o gene do citocromo b parece ser mais apropriado para divergências acima de 80 MYa (IRWIN e col., 1991).

Os genes para citocromo b, as subunidades da NADH desidrogenase, os RNA transportadores e os ribossomais 12S e 16S são os mais utilizados em estudos filogenéticos em lagartos.

O citocromo *b* (cyt *b*) é uma proteína monomérica transmembrana que participa da cadeia de transporte de elétrons. Ela é a única proteína produzida como um monômero funcional, as demais são subunidades de complexos enzimáticos. O citocromo *b* tem domínios conservados e variáveis. Essa enzima é codificada pela cadeia pesada do DNAm (DESJARDINS e MORAIS, 1990).

Baseando-se em regiões conservadas do gene cyt *b*, KOCHER e col. (1989) sintetizaram oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) capazes de promover a amplificação dessa sequência do DNAm de um largo espectro de organismos quando empregados em reações de PCR. Devido a essa característica, os mesmos foram denominados oligonucleotídeos iniciadores universais. Vários segmentos desse gene mitocondrial são altamente conservados entre os táxons e parecem corresponder a regiões funcionalmente importantes na proteína (KOCHER e col., 1989). Outros trabalhos mostraram uma variação significativa no nível de conservação dos aminoácidos em diferentes partes do gene do cyt *b*, sendo a porção 3’ da cadeia leve a mais variável (IRWIN e col., 1991; MARTIN e PALUMBI, 1993; ESPOSTI e col., 1993).

No caso dos genes ribossomais, 12S e 16S, devido a estrutura secundária destes RNAs, eles tem tanto regiões conservadas como regiões variáveis, tornando-os informativos para diferentes tempos de divergência. Os oligonucleotídeos iniciadores para os genes ribossomais são altamente conservados.

Os genes que codificam para o complexo enzimático da NADH desidrogenase (NADH-ubiquinona oxidoreductase) localizado na membrana interna da mitocôndria são bastante utilizados em estudos moleculares. A NADH desidrogenase é uma grande enzima constituída de cerca de 25 cadeias polipeptídicas. A sequência do gene da subunidade ND4 é a mais utilizada em lagartos. Sequências dos RNAs transportadores também aparecem em alguns trabalhos.

❖ GENES NUCLEARES

As sequências nucleares funcionam como marcadores independentes das sequências mitocondriais. Existem relatos na literatura da importância do uso de marcadores independentes em estudos filogeográficos e filogenéticos uma vez que interpretações errôneas podem ser feitas com base em apenas marcadores mitocondriais.

Os genes nucleares que são mais utilizados no grupo dos lagartos são o *c-mos* e o *RAG-1* (DONNELLAN e col., 1999; HARRIS e col., 2001). Alguns poucos estudos

utilizaram trechos de íntrons dos genes da miosina e α -enolase (FRIESEN e col., 1997; WHITING e col., 2003, 2006).

O *c-mos* é um proto-oncogene que codifica uma proteína envolvida no processo de maturação dos oócitos (YEW e col., 1993). Este gene é cópia única, não contém íntrons e tem sido usado para inferir relações de parentesco em vários níveis dentro de Squamata (CARRANZA e col., 2002; PELLEGRINO e col., 2001; WHITING e col., 2003, 2006). A proteína *RAG1* (sigla em inglês para “recombination activating gene 1”) é essencial para a ativação da recombinação no desenvolvimento dos linfócitos e seu gene também não possui íntrons. A α -enolase é uma enzima envolvida na glicólise e a miosina é uma proteína motora. Os genes que codificam essas duas proteínas possuem vários exons e íntrons.

❖ MÉTODOS DE RECONSTRUÇÃO FILOGENÉTICA

De posse das seqüências alinhadas dos genes considerados apropriados, o passo seguinte é a reconstrução das relações filogenéticas a partir desses dados. Dentre os vários métodos de reconstrução, estão aqueles que utilizam a quantificação das diferenças entre as seqüências, expressa na forma de valores ou distâncias, conhecidos como **métodos de distância**. Duas etapas são necessárias neste método. A primeira é o cálculo da distância que é feito a partir de diferentes tipos de distância: distância p; distância Jukes e Cantor (JUKES e CANTOR, 1969); distância Kimura 2-parâmetros (KIMURA, 1980); distância de Tajima e Nei (TAJIMA e NEI, 1984); distância de Tamura e Nei (TAMURA e NEI, 1993), entre outras. Para a escolha de qual distância utilizar é necessário considerar a distância média entre as seqüências, razão entre transição e transversão e a heterogeneidade da taxa de substituição entre os sítios. Após a construção da matriz de distância, um algoritmo deve ser escolhido para a reconstrução da topologia. Os mais utilizados são UPGMA, que assume taxas semelhantes de substituição (SNEATH e SOKAL, 1973) e o agrupamento de vizinhos (neighbor-joining) que procura a árvore de menor soma dos ramos e não depende de taxas de substituição constantes (SAITOU e NEI, 1987). Eles são computacionalmente rápidos uma vez que procedem diretamente para a obtenção da árvore, isto é, o algoritmo define o critério de escolha da árvore.

Em contrapartida, outros métodos de reconstrução utilizam um critério de otimização, isto é, uma suposição evolutiva, para comparar as árvores obtidas e, de acordo com o critério, escolher a(s) melhor(es), exigindo mais tempo computacional. Nesta classe de métodos os algoritmos também são usados, porém como ferramentas para calcular e encontrar as árvores

que têm os melhores valores de acordo com o critério. São eles os métodos de máxima parcimônia (MP), máxima verossimilhança (MV) e a análise bayesiana (MB).

O método de **máxima parcimônia (MP)** defende a escolha das hipóteses mais simples e a não utilização de premissas *ad hoc*. Através deste método, a explicação de caracteres compartilhados entre táxons deve-se a ancestralidade e quando há conflito na distribuição dos caracteres, suposições de homoplasia (convergência, paralelismo ou reversão) são aventadas. Este critério escolhe as árvores que apresentam menor comprimento, isto é, menor número de passos para explicar um conjunto de dados. Na verdade, existem vários métodos distintos que utilizam o critério de parcimônia, porém com diferentes suposições evolutivas: **Parcimônia de Fitch e Wagner** que assume que qualquer estado pode transformar-se diretamente em outro e permite a reversibilidade (formalizado por KLUGE e FARRIS, 1969; FARRIS, 1970; mais tarde generalizado para o uso de caracteres multi-estado não ordenados por FITCH, 1971); **Parcimônia de Dollo**, que tem como restrição o fato de cada estado de caráter só poder se originar uma vez na árvore (FARRIS, 1977); **Parcimônia de Camin-Sokal**, na qual um estado de caráter derivado não pode retornar a sua condição ancestral (CAMIN e SOKAL, 1965); **Parcimônia de Transversão**, que considera apenas as substituições do tipo transversão. Os métodos de parcimônia de Dollo e Camin-Sokal não são apropriados para análises de seqüências, uma vez que os caracteres multiestados (A, T, C e G) não podem ser ordenados, no primeiro caso, e a reversibilidade não é permitida no segundo caso. Existem ainda, alguns autores que utilizam uma matriz de custos para as diferentes substituições em suas análises de parcimônia. Um dos problemas vistos neste tipo de procedimento é como determinar de forma objetiva esses custos.

Existem opositores e defensores do método de máxima parcimônia. Os que advogam contra chamam a atenção para o fato de que este método faz sim suposições e que a violação destas pode levar a hipóteses incorretas sobre a filogenia sob um modelo de evolução simples (FELSENSTEIN, 1978). Alguns autores relatam que, tanto em estudos com dados moleculares como com caracteres morfológicos, quando o conjunto de dados apresenta uma quantidade de homoplasias grande relativamente à quantidade de sítios informativos, a abordagem com MP pode levar a resultados incorretos (JIN e NEI, 1990; NEI e col., 2000), devido ao fenômeno de atração de braços longos (FELSENSTEIN, 1978). Para contornar essa limitação do método, pode-se acrescentar mais táxons ou limitar as análises aos caracteres mais conservados (menos homoplásticos) ou ainda escolher um gene com menos variação. Alguns autores dizem ainda que mesmo sob condições onde a parcimônia é consistente, métodos que incorporam modelos de mudança evolutiva são mais efetivos no uso dos dados.

O método de **máxima verossimilhança** (MV) avalia a probabilidade que o modelo evolutivo escolhido tenha gerado as seqüências observadas e, dessa forma, as filogenias são inferidas através da busca de árvores que tenham as probabilidades mais altas. Para calcular a probabilidade da árvore toda é necessário considerar as probabilidades da ocorrência de cada estado em cada nó da árvore como uma função da topologia da árvore e do comprimento dos braços. FELSENSTEIN (1981, 1993) foi o primeiro a utilizar este método para analisar seqüências nucleotídicas. Para calcular essas probabilidades são utilizados modelos evolutivos (JUKES e CANTOR, 1969; KIMURA dois parâmetros 1980 (K2P); TAVARÉ, 1986 (GTR), TAMURA e NEI, 1993 (TrN).

Para a **escolha do modelo** mais adequado aos dados pode-se utilizar o programa **MODELTEST 3.7** (POSADA e CRANDALL, 1998) que realiza o teste hierárquico de razão de verossimilhança (hLRT) conjuntamente com o PAUP. O cálculo de verossimilhança é feito para 56 modelos evolutivos. Os valores de LRTs dos modelos são comparados, dois a dois, do mais simples ao mais complexo. Quando um modelo mais complexo não for significativamente melhor do que um mais simples, o modelo mais simples que melhor se ajusta aos dados observados é o escolhido.

Enquanto o método de parcimônia ignora o comprimento dos ramos quando avalia uma árvore, a verossimilhança considera que mudanças são mais prováveis ocorrerem em braços longos do que em curtos e, conseqüentemente, a estimativa do comprimento dos ramos é um aspecto importante do método. Os defensores argumentam que esta diferença na análise das informações contidas na árvore explica a consistência da máxima verossimilhança em muitas situações frente à parcimônia.

Com relação aos modelos evolutivos, é interessante ressaltar aqueles que levam em consideração a existência de distintas taxas de substituição nos diferentes sítios de uma seqüência. As taxas de substituição podem ser diferentes de acordo com a posição do nucleotídeo (1^a, 2^a ou 3^a posição) na trinca que codifica o códon no caso de um gene codificador de proteína e em sítios pareados (*stems*) e não pareados (*loops*), no caso de um gene ribossomal.

Simplificadamente, pode-se dizer que o método de parcimônia procura soluções que minimizem a quantidade de mudanças evolutivas necessárias para explicar os dados. Em contrapartida, o método de verossimilhança tenta estimar a real quantidade de mudanças de acordo com o modelo evolutivo.

Com relação aos **algoritmos de busca das árvores** utilizados em análises de MP e MV, de acordo com o critério de otimização dos caracteres, eles podem ser **exatos** (“busca exata” e “branch and bound”) ou **heurísticos**. Os primeiros buscam as melhores árvores

dentro do conjunto completo de árvores e, dessa forma, a busca exata encontrará a(s) árvore(s) que satisfaça(m) o critério de otimização. Porém esta busca se torna impraticável quando existe um número grande de táxons. Já no caso de algoritmos heurísticos, a(s) melhor(es) árvore(s) são procuradas dentro de um subconjunto de árvores. Neste último caso, não se deve perder de vista que a(s) árvore(s) escolhida pode ser subótima.

Outro método de reconstrução que vem ganhando muitos adeptos é a **análise bayesiana** (MB). Esse método é semelhante ao de máxima verossimilhança, porém difere no uso das probabilidades: as probabilidades não são estimadas baseadas em modelos *a priori*, mas após se obter informações sobre os dados. A inferência filogenética é baseada nas probabilidades *a posteriori* das árvores filogenéticas. É possível analisar diferentes conjuntos de dados, com distintos modelos para cada um, isto é, permite a análise concatenada. O programa que realiza a análise bayesiana é o MRBAYES v.3.0b4 desenvolvido por RONQUIST e HUELSENBECK (2003). Este programa usa as cadeias Markovianas para se aproximar das probabilidades *a posteriori* das árvores filogenéticas. O programa gera dois arquivos importantes. Aquele com extensão .p contém os parâmetros que foram usados ao longo da execução do programa e é usado para determinar quando as cadeias atingem a estabilidade, através da construção de um gráfico de curva. As gerações anteriores ao ponto de estabilidade da cadeia são descartadas do outro arquivo (extensão .t) usado para a leitura das árvores e estimativa do consenso pela regra da maioria dos 50%. Dessa forma, é obtida a árvore com os valores de credibilidade.

Em todos os métodos de análise acima citados, o alinhamento deve ser previamente feito e fornecido ao programa de reconstrução.

Singularmente, uma outra metodologia conhecida como otimização direta (WHEELER, 1996), implementada no programa de computador POY (WHEELER e col., 2003), faz o alinhamento simultaneamente à reconstrução da árvore, utilizando um único critério para o procedimento de análise. Análises de MP e MV podem ser feitas neste programa. Matrizes contendo diferentes conjuntos de dados podem ser analisadas (dados concatenados). Ele pode realizar análises usando modelos de evolução de seqüências sob uma análise de verossimilhança, usando o mesmo modelo tanto para o alinhamento como para a reconstrução da árvore. Tem sido demonstrado que o alinhamento obtido através do POY produz árvores com ramos significativamente mais curtos que aquelas que são produzidas a partir de outros métodos de alinhamento. É possível também se testar diferentes matrizes de peso para os gaps, as transições e as tranversões e usar aquelas que mostram uma maior congruência entre os conjuntos de dados, no caso de matrizes concatenadas.

Outro aspecto importante a ser considerado nas reconstruções filogenéticas diz respeito aos **grupos externos**. Eles devem, sempre que possível, ser escolhidos com base em dados anteriores que indiquem que são táxons próximos, mas que necessariamente divergiram antes do processo de diferenciação dos táxons do grupo interno. Deve-se utilizar mais que um grupo externo (para uma revisão veja NIXON e CARPENTER, 1993). Várias observações indicam que o uso de grupos externos distantemente relacionados pode ocasionar erros de enraizamento e, conseqüentemente, reconstruções filogenéticas equivocadas (LEE e col., 1997).

❖ ÍNDICES DE SUPORTE DOS CLADOS

A fim de verificar o quão confiáveis são as estimativas e as conclusões retiradas da análise, isto é, a robustez da filogenia obtida, são realizados testes que fornecem os valores de suporte dos ramos. Os mais utilizados são o *bootstrap* e o índice de decaimento de Bremer. No caso da análise bayesiana, os valores de confiabilidade são as probabilidades *a posteriori* dos ramos, calculadas pela regra da maioria de 50% das árvores obtidas. Os valores das probabilidades *a posteriori* são considerados superestimados quando comparados a outros valores de suporte (SUZUKI e col., 2002).

O *bootstrap* (BP) é o mais usado tanto em árvores de distância, como de parcimônia e verossimilhança. Os valores são obtidos usando-se o programa PAUP 4.0b10 (SWOFFORD, 2003) através da amostragem aleatória de sítios, com reposição dos dados. Em cada reamostragem, o número total de dados mantém-se constante. Além disso, cada posição de nucleotídeo tem a mesma chance de ser amostrada, o que leva a algumas serem contadas mais de uma vez, enquanto outras não são amostradas. A cada reamostragem uma árvore-réplica é construída. Ao final de todas as réplicas, a árvore final é estimada. Na versão de FELSENSTEIN (1985), a árvore com os valores de *bootstrap* mostra a topologia consenso de todas as árvores-réplica, que pode ser distinta da árvore original. Na segunda versão, a topologia da árvore final é exatamente a mesma da árvore original, contendo as percentagens com que cada clado apareceu nas réplicas (programa MEGA). Os valores de *bootstrap* não indicam a chance da topologia estar correta, mas sim o intervalo de confiança dentro do qual está contida a filogenia que seria estimada em repetidas amostragens de muitos caracteres. Não existe consenso sobre o significado dos valores de *bootstrap*. Valores acima de 70% são considerados bons por alguns autores (HILLIS e BULL, 1993). Outros autores, como LI (1997), consideram bem apoiados valores iguais ou superiores a 95%. CHEN e col. (2003)

utilizaram a repetibilidade para averiguar a confiabilidade dos ramos, isto é, um clado que é recuperado várias vezes a partir de diferentes conjuntos de dados, mesmo com baixos valores de *bootstrap*, é melhor apoiado que um clado com altos valores de *bootstrap*, porém obtido a partir de só um conjunto de dados (BAKER e DESALLE, 1997).

O **índice de decaimento de Bremer** (BREMER, 1994) refere-se ao número de passos extras necessários para colapsar o ramo e é obtido apenas para análises de máxima parcimônia. É importante salientar que os valores de suporte de Bremer não devem ser comparados entre conjuntos de dados diferentes uma vez que estes valores são limitados pelo número de caracteres. Dessa forma espera-se que esses valores sejam maiores quando se utilizam dados moleculares do que a partir de dados morfológicos, que geralmente contêm bem menos caracteres. Devido a essas características não é claro definir quais valores são suficientemente altos para considerar o grupo com um bom suporte. Esses valores de suporte são obtidos através do programa TreeRot.v2 (SORENSEN, 1999) conjuntamente com o PAUP 4.0b10 (SWOFFORD, 2003). No caso de análises concatenadas a partir de conjuntos de dados diferentes, é possível se calcular os valores de Bremer referentes a cada uma das partições.

Na análise de máxima parcimônia podem ser obtidos ainda alguns índices. O índice de consistência (IC), desenvolvido por KLUGE e FARRIS (1969) revela a quantidade de homoplasias relativamente ao número total de passos na árvore. É um número que varia de zero a um e será menor quanto maior for a proporção de eventos homoplásticos em relação ao número de sinapomorfias no cladograma. O uso de caracteres não informativos infla o índice de consistência, o que pode ser problemático em comparações. Com o aumento do número de táxons o índice de consistência diminui. Outro índice é o de retenção (IR) que indica a proporção de autapomorfias e homoplasias em relação ao total de passos (FARRIS, 1989). Como nem todos os caracteres contribuem para a topologia da árvore, o IC pode estar superestimado. Para corrigir isso, FARRIS (1989) propôs o índice de consistência reescalado (RC), que é o produto de IC pelo IR.

❖ HIPÓTESES FILOGENÉTICAS

Não existe na literatura consenso a respeito do melhor método de reconstrução filogenética. Alguns autores afirmam que a etapa de escolha dos genes e o alinhamento das seqüências é muito mais crucial para chegar na melhor árvore que os métodos de reconstrução utilizados. Cada método se baseia em diferentes suposições a respeito dos processos evolutivos, cada um tendo diferentes princípios, particularidades e limitações. O que não se

deve perder de vista é que a filogenia obtida é apenas uma estimativa, uma hipótese que explica a história evolutiva baseada na informação limitada contida nos dados utilizados na reconstrução.

As hipóteses filogenéticas elaboradas a partir das seqüências fornecem informações relevantes que nos auxiliam no entendimento dos processos de diversificação que ocorrem durante a evolução dos organismos. A concordância dos padrões geográficos de variação do DNAm^t e das taxas de divergência de seqüências em grupos taxonômicos diversos sugere, implicitamente, uma história similar, se não idêntica (PATTON e col., 1997). A ausência de um padrão geral pode ser reflexo de histórias evolutivas complexas devido à influência diferencial de eventos paleogeográficos e paleoclimáticos na diferenciação dos grupos taxonômicos (CRACRAFT e PRUM, 1988).

O estabelecimento de hipóteses filogenéticas permite que possamos entender melhor os processos evolutivos e contribui para a taxonomia e sistemática. Também servem de base para estudos a respeito de especiação, biogeografia, comportamento, fisiologia e outros estudos comparativos.

Algumas excelentes publicações abordam a utilização de dados moleculares na reconstrução de filogenias nos mais diversos níveis taxonômicos. Dentre elas, destaca-se o trabalho de HILLIS e col. (1996) que apresenta detalhadamente as metodologias desenvolvidas para a obtenção e manipulação dos dados moleculares, além de discutir os vários métodos de inferência filogenética numa abordagem bastante ampla. Outra obra importante nessa área, publicada por LI (1997), inclui discussões acerca da dinâmica das mudanças evolutivas em nível molecular, dos agentes que atuam no processo evolutivo, das novidades evolutivas reveladas pelos dados moleculares e, finalmente, da análise estatística dos dados moleculares sob uma perspectiva evolutiva.

A existência de um **relógio molecular** é outro assunto controverso. Essa hipótese assume que, para uma determinada seqüência de DNA, as mutações se acumulam a uma taxa constante. Conseqüentemente, a diferença entre as seqüências de duas espécies seria proporcional ao tempo de divergência destas a partir do ancestral comum mais recente. Isso não significa que as taxas evolutivas em todos os genes ou diferentes regiões gênicas sejam iguais. É possível se verificar a existência do relógio molecular utilizando o PAUP e o teste da razão de verossimilhança (LRT). Uma vez que a hipótese do relógio molecular assume que as taxas de substituição entre os ramos são as mesmas, o LRT pode ser usado para comparar valores gerados pela análise de máxima verossimilhança forçando e não forçando o relógio molecular (SCHNEIDER, 2003).

❖ ESTUDOS MOLECULARES COMBINADOS COM OUTROS DADOS

Uma grande variedade de análises tem sido realizada com base em seqüências de DNA em vários vertebrados (LANYON e HALL, 1994; HEIDRICH e col., 1995; KRAJEWSKI e KING, 1996; FRIESEN e ANDERSON, 1997; MATTHEE e ROBINSON, 1997; MINDELL, 1997; MIYAKI e col., 1998). Em lagartos, é comum a análise combinada de seqüências de diferentes genes mitocondriais (FU, 2000; JESUS e col., 2005; TORRES-CARVAJAL e col., 2005), destes com seqüências de genes nucleares (PELLEGRINO e col., 2001; WHITING e col., 2003; TOWNSEND e col., 2004) e, também, com caracteres morfológicos (SITES e col., 1996; REEDER e MONTANUCCI, 2001; FROST e col., 2001a,b; SCHULTE e col., 2003; HODGES e ZAMUDIO, 2004) e, menos freqüentemente, com dados citogenéticos (FLORES-VILLELA e col., 2000; BOSCH e col., 2003; PELLEGRINO e col., 2005a). Existem defensores e opositores do uso concatenado de dados de diferentes naturezas. HUELSENBECK e col. (1996) discutem esses diferentes pontos de vista. A solução mais lógica parece ser primeiramente analisar os conjuntos de dados separadamente e, se não houver significantes incongruências, passar a análise combinada dos diferentes dados (como feito, por exemplo, por SITES e col., 1996).

O trabalho de PELLEGRINO e col. (2005a) com o pequeno geconídeo *Gymnodactylus darwinii* exemplifica bem estudos que envolvem a associação de dados moleculares e citogenéticos e a utilização de diferentes métodos de reconstrução filogenética. Este geconídeo apresenta uma ampla distribuição ao longo da Floresta Atlântica (RN até SP, inclusive em várias ilhas da região de Ubatuba) e uma marcante diferenciação morfológica ao longo dessa distribuição. Estes autores investigaram os padrões de divergência genética ao longo dessa distribuição e a relação entre o padrão de distribuição das populações de *darwinii* e os rios que ocorrem ao longo da Floresta Atlântica. Dois cariótipos distintos foram detectados: (1) composto de 38 cromossomos, presente nas populações continentais e insulares de São Paulo e do Espírito Santo; (2) composto por 40 cromossomos, presentes em todas as populações do Nordeste. Os autores utilizaram seqüências de 800pb do gene do citocromo *b* de 42 exemplares. As informações recuperadas a partir dos métodos de máxima parcimônia, verossimilhança e análise bayesiana foram semelhantes. Foram evidenciados três clados principais: um composto pelas populações de *darwinii* de São Paulo, das ilhas próximas a Ubatuba e do Espírito Santo (Clado sudeste), com $2n=38$; os outros dois clados do nordeste associados ao cariótipo $2n=40$: o clado NE1 contendo as populações do nordeste ao sul da Bahia de Todos os Santos e o clado NE2 contendo as populações do nordeste ao norte

da Bahia de todos os Santos. Estes clados, por sua vez, apareceram subdivididos. Tanto os três principais clados como os subclados têm sua separação associada a rios que ocorrem ao longo da Mata Atlântica (Rio Doce, Rio Paraíba, Rio Paraguaçu, Rio Jequitinhonha e o Rio São Francisco). Os autores reconheceram, com base na concordância dos filogrupos do DNAm e dados cromossômicos, cada citótipo como uma espécie válida (pelo menos duas espécies distintas estariam sob o nome *G. darwinii*) e sugeriram que os rios podem ter funcionado como barreiras no processo de diferenciação destes clados (Figura 12). Entretanto, os autores ressaltam a necessidade de uma amostragem mais abrangente para testar a hipótese dos rios da bacia da costa leste como possíveis barreiras à especiação.

Figura 12. Árvore de máxima parcimônia, com a divisão dos clados relacionada aos principais rios. À esquerda os citótipos correspondentes (PELLEGRINO e col., 2005a)

Outros estudos feitos com lagartos da nossa fauna envolvem o gênero de microteídeo *Leposoma*. Este gênero ocorre exclusivamente nas Florestas Tropicais da América Central e do sul, desde a Costa Rica até a costa Atlântica no leste do Brasil. O gênero contém 15 espécies separadas em dois grupos com base em similaridades morfológicas, com distribuição disjunta. O grupo *parietale*, na Amazônia do qual faz parte a espécie partenogenética *L.*

percarinatum e o grupo *scincoides*, na mata Atlântica, sendo que a espécie *L. baturitensis*, ocorre na Serra de Baturité, um brejo florestado nas Caatingas do Ceará. Em 1999, PELLEGRINO e col. estudaram alguns exemplares de duas espécies da Amazônia (*L. guianensis* e *L. osvaldoi*) e uma espécie da Floresta Atlântica. Um cariótipo com $2n=44$ foi observado na Amazônia e um cariótipo distinto com $2n=52$ na Floresta Atlântica. A localização das RONS e o padrão de bandas CBG mostrou-se distinto entre as duas espécies Amazônicas. Comparações do padrão de bandamento RBG e os estudos de hibridação com sondas teloméricas, levaram os autores a concluir que rearranjos do tipo fusão/fissão centríca e inversões pericêntricas estariam envolvidos na diferenciação dos cariótipos. Em 2003, os mesmos autores descrevem um cariótipo triploide para uma população de *L. percarinatum* ($3n=66$), sugerindo sua origem a partir do cruzamento híbrido entre uma espécie com o cariótipo semelhante ao de *L. guianense* e *L. osvaldoi* com uma população diplóide unissexual partenogenética críptica de *L. percarinatum*, também com $2n=44$. Esses resultados cariotípicos levaram os autores a investir em análises moleculares para testar o monofilismo das espécies amazônicas e atlânticas e investigar a origem da espécie *L. percarinatum*. Sequências parciais de três genes mitocondriais (12S, ND4 e citocromo *b*) e de um gene nuclear (*c-mos*) de 35 exemplares (4 espécies da Amazônia e 7 espécies da Floresta Atlântica) foram analisadas através de máxima parcimônia, máxima verossilhança e análise bayesiana, separadamente e combinadas. Os resultados obtidos a partir destes três métodos foram semelhantes. Tanto o grupo *scincoides* (Floresta Atlântica) como o *parietale* (Floresta Amazônica) são recuperados como monofiléticos. As espécies *L. baturitensis*, *L. nanodactylus*, *L. puk* têm uma posição basal no grupo *scincoides*, o que sugere que *L. baturitensis*, aquela espécie que ocorre isolada no enclave de mata Atlântica, está isolada há muito tempo, com nenhuma indicação de contato posterior desse enclave com a mata Atlântica. As populações de *L. scincoides* não são monofiléticas, sugerindo a existência de mais de uma espécie sob esse nome. Com relação à espécie partenogenética triploide *L. percarinatum*, os dois clones apresentam-se bem divergentes geneticamente (cerca de 10% de divergência), indicando que o DNAm deve ter sido herdado a partir de duas espécies maternas ancestrais, com os clones representando unidades taxonômicas distintas (PELLEGRINO e col., 2005b).

Outros estudos moleculares em lagartos que procuram compreender as relações filogenéticas e os processos e padrões de diversificação são encontrados na literatura (FU, 1999; TORRES-CARVAJAL e col., 2005; CARRANZA e col., 2005).

Mais especificamente na família Leiosauridae, o único trabalho envolvendo estudos moleculares é o de FROST e col. (2001a), no qual os autores utilizam dados morfológicos e

de sequenciamento de genes mitocondriais (genes ribossomais 12S e 16S e o gene para o RNA transportador do aminoácido valina) no estudo das relações filogenéticas entre as famílias e gêneros de iguania pleurodontes.

Nossa fauna tem aspectos bem interessantes, como a ampla distribuição de algumas espécies e gêneros, distribuição disjunta de espécies, ocorrência de algumas populações em refúgios de floresta na caatinga (Figura 13). Este cenário é propício para estudos a respeito dos processos evolutivos envolvidos no surgimento dos padrões observados, do papel dos rios nesses padrões, da história das Florestas e assim por diante.

* Limite da caatinga

* Serra das confusões

Figura 13. Enclaves da Mata Atlântica no Brasil: **1.** Serra da Ibiapaba, CE (1.958 Km²); **2.** Sobral, CE (562 Km²); **3.** Itapagé, CE (990 Km²); **4.** Serra de Baturité, CE (870 Km²); **5.** Crato, CE (966 Km²); **6.** Brejo Paraibano, PB (791 Km²); **7.** Camalaú, PB (626 Km²); **8.** Brejo da Madre de Deus, PE (455 Km²); **9.** Serra da Jibóia, BA (743 Km²).

II. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente trabalho foi estudar exemplares de diferentes espécies de lagartos do gênero *Enyalius* provenientes de várias localidades brasileiras, sob o ponto de vista citogenético e molecular. Este estudo visou mais especificamente:

- ✓ Caracterizar os cariótipos das espécies quanto ao número e morfologia dos cromossomos, e detectar a presença de mecanismos cromossômicos de determinação do sexo;
- ✓ Detectar possíveis casos de variação cromossômica e a ocorrência de polimorfismos de autossomos e cromossomos sexuais;
- ✓ Localizar as regiões organizadoras de nucléolos (RONs) e estudar possíveis variações;
- ✓ Comparar os cariótipos obtidos com aqueles já descritos na literatura;
- ✓ Propor uma hipótese filogenética molecular para as espécies do gênero *Enyalius* e contribuir para o entendimento acerca da diversidade de espécies no gênero e da variabilidade intra-específica;
- ✓ Associar as análises moleculares e citogenéticas, contribuindo para a compreensão das relações de parentesco, de aspectos biogeográficos e da história evolutiva do gênero.

III. MATERIAL

Grande parte do material utilizado neste estudo provém de várias excursões científicas realizadas pelas equipes do Dr. Miguel T. Rodrigues (Departamento de Zoologia-USP) e da Dra. Yatiyo Yonenaga-Yassuda (Departamento de Genética e Biologia Evolutiva-IBUSP). Outros pesquisadores também nos enviaram amostras de tecido de distintas localidades brasileiras. As espécies e as localidades estudadas estão nas Figuras 14 e 15. Os tecidos estavam armazenados em ultra-freezer ou etanol absoluto no Banco de Tecidos do Departamento de Zoologia do IBUSP. Os exemplares foram depositados na seção de Herpetologia do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP).

Nos estudos citogenéticos foram analisados 27 exemplares de *Enyalius*. Para as análises moleculares, foi extraído DNA de fragmentos de tecidos de 116 indivíduos pertencentes às várias espécies de *Enyalius* e às espécies usadas como grupos externos (*Urostrophus vaultieri*, *Anisolepis grilli* e *Anisolepis longicauda*). A Tabela 5 contém a lista de exemplares estudados tanto sob o enfoque citogenético como molecular.

As subespécies de *E. catenatus* são tratadas, nesta tese, como espécies válidas, portanto *E. bibronii*, *E. catenatus* e *E. pictus*, segundo sugestão de RODRIGUES e col. 2006.

Tabela 5. Listagem das espécies, localidades, códigos de identificação dos exemplares utilizados nas análises filogenéticas, números de laboratório e campo, regiões gênicas mitocondriais e nucleares amplificadas (indicadas por um X).

Espécie	Localidade	Código	Nº Lab	Nº Campo	DNA mitocondrial			DNA Nuclear <i>c-mos</i>
					ND4	Cytb	16S	
<i>E. bibroni</i>	Serra da Jibóia, BA (12°56'S, 39°31'W)	bibr_BA 1	LG 1377	-	X	X	X	X
	Pacoti, CE (4°13'S, 38°55'W)	bibr_CE 1	LG 1406	MRT 127	X	X	X	X
	Serra das Confusões, PI (08°55'S, 43°26'W)	bibr_PI 1	-	PNSC 8097	X	X	X	X
<i>E. bilineatus</i>	Nova Ponte, MG (19°08'S, 47°40'W)	bili_MG 1	LG 816	-	X	X	X	X
		bili_MG 2	LG 919	-	X	X	X	X
	Mariana, MG (20°22'S, 43°24'W)		-	JC 771	X	X	-	-
			-	JC 777	X	X		
		bili_MG 3	-	JC 779	X	X	X	X
			-	JC 778	X	X	-	-
	Belo Horizonte, MG (19°55'S, 43°56'W)	bili_MG 4	-	JC1051	X	X	X	-
			-	JC 1052	X	X	X	-
	Santa Teresa, ES (19°56'S, 40°36'W)	bili_ES 1	LG 2143	-	X	X	X	X
	Luziania, GO (16°15'S, 47°57'W)	bili_GO 1	LG 2230*	MRT 11488	X	X	X	-
	Brasília, DF (15°46'S, 47°55'W)	bili_DF1	LG 1467	-	X	X	X	X
<i>E. brasiliensis</i>	Santa Teresa, ES (19°56'S, 40°36'W)	bras_ES 1	LG 2144	-	X	X	X	X
<i>E. catenatus</i>	Centro Experimental Almada, Ilhéus, BA (14°47'S, 39°02'W)	cate_BA 1	LG 2055*	MD 3017	X	X	X	X
		cate_BA 2	LG 2058*	ABA 45	X	X	X	X
			LG 2059*	ABA 46	X	X	-	-
			LG 2060*		X	X	-	-

Espécie	Localidade	Código	Nº Lab	Nº Campo	DNA mitocondrial			DNA Nuclear <i>c-mos</i>
					ND4	Cytb	16S	
<i>E. catenatus</i>	Una, BA (15°17'S, 39°04'W)	cate_BA 3	LG 1298	-	X	X	X	X
		cate_BA 4	-	MD 1179	X	X	X	X
		cate_BA 5	-	MD 1780	X	X	X	X
	Serra do Teimoso, Jussari, BA (15°11'S, 39°29'W)	cate_BA 6	-	MRT 5817	X	X	X	X
			-	MRT 5815	X	X	-	-
		cate_BA 7	-	MRT 5886	X	X	X	X
			-	MRT 5889	X	-	-	-
			-	MRT 5844	X	X	-	-
	Parque Estadual Serra de Conduru, Urucuca, BA (14°35'S, 39°17'W)	cate_BA 8	-	4017	X	X	X	X
	Itacaré, BA (14°16'S, 38°59'W)	cate_BA 9	-	4042	X	X	X	X
			-	4048	X	X	-	-
	Ibateguara, AL (8°58'S, 35°56'W)		-	USG 47	X	X	-	-
		cate_AL 1	-	USG 70	X	X	X	X
			-	USG 54	X	X	-	-
	São José da Laje, AL (9°0'S, 36°03'W)		-	USG 37	X	X	-	-
			-	USG 38	X	X	-	-
		cate_AL 2	-	USG 52	X	X	X	X
	Santo Agostinho, PE (08°21'S, 34°56'W)	cate_PE 1	LG 2169	-	X	X	X	X
	Parque das Dunas, Natal, RN (5°47'S, 35°12'W)	cate_RN 1	LG 2182	-	X	X	X	X
			-	CHBEZ 1032	X	X	-	-
		cate_RN 2	-	CHBEZ 1033	X	X	X	X
<i>E. pictus</i>	Leme do Prado, MG (17°05'S, 42°41'W)		-	JC 1079	X	-	-	-
		pict_MG 1	-	JC 1080	X	X	X	-
			-	JC1081	X	-	-	-
	Pote, MG (17°48'S, 41°47'W)	pict_MG 2	-	MZUFV 436	X	X	X	X
			-	MZUFV 437	X	X	-	-
			-	MZUFV 438	X	X	-	-

Espécie	Localidade	Código	Nº Lab	Nº Campo	DNA mitocondrial			DNA Nuclear <i>c-mos</i>
					ND4	Cytb	16S	
<i>E. pictus</i>	Almenara, MG (16°11'S, 40°41'W)	pict_MG 3	LG 2196	-	X	X	X	X
	Porto Seguro, BA (16°26'S, 39°03'W)	pict_BA 1	LG 959	-	X	X	X	X
	Reserva da Companhia da Vale do Rio Doce, Linhares, ES (19°08'S, 40°03'W)	pict_ES 1	LG 2293*	MRT 12080	X	X	X	X
	-	-	-	MRT 12349	X	X	-	-
<i>E. iheringii</i>	Juréia, SP (24°19'S, 46°59'W)	iher_SP 1	LG 929	-	X	X	X	X
	Pilar do Sul (23°48'S, 47°42'W)	iher_SP 2	LG 1383	-	X	X	X	X
	São Bernardo do Campo, SP (23°41'S, 46°33'W)	iher_SP 3	LG 1943	IT-H 155	X	X	X	X
		-	-	IT-H 070	X	X	-	-
	Paraitinga, SP (23°13'S, 45°18'W)	-	LG 2093♠	-	-	-	-	-
		-	LG 2094*	UNIBAN 2019	X	X	X	X
		iher_SP 4	LG 2095*	UNIBAN 2097	X	X	X	X
		-	LG 2096♠	-	-	-	-	-
		iher_SP 5	LG 2145*	UNIBAN 2474	X	X	-	-
		-	LG 2146*	UNIBAN 2475	X	X	-	-
	Piaçaguera, Santos, SP (23°57'S, 46°20'W)	iher_SP 6	LG 2151*	-	X	X	X	X
	Caucaia do Alto, SP (23°41'S, 47°01'W)	iher_SP 7	LG 2155*	-	X	X	X	X
	Biritiba-Mirim, SP (23°34'S, 46°02'W)	-	LG 2161♠	-	-	-	-	-
		-	LG 2162*	UNIBAN 2572	X	-	-	-
		iher_SP 8	LG 2163*	UNIBAN 2571	X	X	X	X
	Piedade, SP (23°42'S, 47°25'W)	iher_SP 9	LG 2250*	-	X	-	X	-
	Tapiraí, SP (23°57'S, 47°45'W)	iherSP 10	LG 2181	MRT 10873	X	X	X	X

Espécie	Localidade	Código	Nº Lab	Nº Campo	DNA mitocondrial			DNA Nuclear <i>c-mos</i>
					ND4	Cytb	16S	
<i>E. iheringii</i>	Luiz Alves, SC (26°43'S, 48°55'W)	iher_SC 1	LG 2327	-	-	-	X	X
	Juquitiba, SP (23°55'S, 47°04'W)		LG 2259♠		-	-	-	-
<i>E. leechii</i>	Aripuanã, MT (10°10'S, 59°27'W)	leec_MT 1	-	968154	X	X	X	X
			-	968156	X	X	-	-
	Juruena, MT (10°19'S, 58°21'W)	leec_MT 2	-	977148	X	X	X	X
	Cláudia, MT (11°30'S, 54°53'W)	leec_MT 3	-	976236	X	X	X	X
			-	976041	-	X	-	-
	Apiacás, MT (09°32'S, 57°26'W)	leec_MT 4	LG 1222	968240	X	X	X	-
		-	LG 1249	-	X	X	-	-
		-	-	651	X	X	-	-
		-	-	566	X	X	-	-
		-	-	968402	-	X	X	-
<i>E. perditus</i>	Pirajú, SP (23°11'S, 49°23'W)	perd_SP 1	LG 1135	-	X	X	X	X
	Serra da Cantareira, SP (23°22'S, 46°36'W)	-	LG 1500	UNIBAN 016	-	X	-	-
		perd_SP 2	LG 1501	UNIBAN 018	X	X	X	X
			LG 1502	UNIBAN 017	X	X		-
		perd_SP 4	LG 1505	UNIBAN 015	X	X	X	-
	Juquitiba, SP (23°55'S, 47°04'W)	perd_SP 3	LG 2079	IT-H 482	X	X	X	-
		-	LG 2081*	IT-H 489	X	X	-	-
		-	LG 2082*	IT-H 490	X	X	-	-
		-	-	IT-H 492	-	X	-	-
		-	LG 2089*	IT-H 494	X	X	-	-
		-	-	IT-H 491		X	-	-
	Estação Biológica de Boracéia, Salesópolis, SP (23°31'S, 45°50'W)	perd_SP 5	-	A1	X	X	X	X
		-	-	A2	X	X	-	-
		-	-	A3	X	X	-	-
		-	-	A4	X	X	-	-
		-	-	B1	X	X	-	-

Espécie	Localidade	Código	Nº Lab	Nº Campo	DNA mitocondrial			DNA Nuclear <i>c-mos</i>
					ND4	Cytb	16S	
<i>E. perditus</i>	Estação Biológica Alto da Serra, Paranapiacaba, SP (23°46'S, 46°18'W)	-	-	MRT 10418	X	X	-	-
		perd_SP 6	-	MRT 10878	X	X	X	-
	Ortigueira, PR (24°12'S, 50°56'W)	perd_PR 1	-	II-H 129	X	X	X	-
	Wenceslau Braz, PR (23°52'S, 49°48'W)	-	-	II-H 177	X	-	-	-
		perd_PR 2	-	II-H 178	X	X	X	X
		-	-	II-H 196	X	X	-	-
		-	-	II-H 197	X	X	-	-
		-	-	II-H 214	X	X	-	-
	Pinhalão, PR (23°47'S, 50°03'W)	perd_PR 3	-	II-H 001	X	X	X	X
		-	-	II-H 002	X	X	-	-
	Parque Estadual Nova Baden, Lambari, MG (21°58'S, 45°21'W)	-	-	VXS 229	X	X	-	-
		perd_MG 1	-	VXS 230	X	X	X	X
		-	-	VXS 231	X	-	-	-
	Vale Verde, Parque Nacional do Caparaó, MG (20°25'S; 41°50'W)	-	-	MRT 10787	X	X	X	-
		perd_MG 2	-	MRT 10788	X	X	X	-
		-	-	MRT 10797	X	X	X	-
	Pedra Roxa, Parque Nacional do Caparaó, ES (20°24'S; 41°43'W)	perd_ES 1	-	MRT 10846	X	X	X	-
	Santa Marta, Parque Nacional do Caparaó, ES (20°29'S; 41°44'W)		LG 2252♠		-	-	-	-
	Córrego do Calçado, Parque Nacional do Caparaó, ES (20°28'S; 41°44'W)		LG 2254♠		-	-	-	-
• <i>E. sp. n</i>	Mucugê, BA (13°00'S, 41°22'W)	-	LG 2240*	MRT 11627	X	X	X	-
		sp_BA 1	LG 2241*	MRT 11628	X	X	X	X

Espécie	Localidade	Código	Nº Lab	Nº Campo	DNA mitocondrial			DNA Nuclear <i>c-mos</i>
					ND4	Cytb	16S	
• <i>E. sp.n</i>	Mucugê, BA (13°00'S, 41°22'W)		LG 2242*	MRT 11626	X	X	-	-
♣ <i>Urostrophus vautieri</i>	Estação Biológica de Boracéia, Salesópolis, SP (23°31'S, 45°50'W)	vaut_SP 1	LG 1399	-	X	X	X	X
	Jundiaí, SP (23°11'S, 46°53'W)	-	LG 487	-	-	X	-	-
♣ <i>Anisolepis grilli</i>	Buri, SP (23°47'S, 48°35'W)	gril_SP1	-	IT-H 620	X	X	X	X
♣ <i>Anisolepis longicauda</i>	Usina Hidrelétrica Porto Primavera, Presidente Epitácio, SP (21°45'S, 52° 06'W)	long_SP 1	LG 1370	-	X	X	X	X

* exemplares estudados citogeneticamente

♠ exemplares somente estudados citogeneticamente

• espécie ainda não formalmente descrita

♣ espécies utilizadas como grupos externos

Figura 14. Exemplos do gênero *Enyalius* analisados no presente trabalho. **a)** *E. bilineatus*. **b)** *E. bibroni*. **c)** *E. catenatus*. **d)** *E. iheringii*. **e)** *E. leechii*. **f)** *E. perditus*. **g)** *E. pictus*. **h)** *E. sp. n.* Fotos de Miguel Trefaut Rodrigues (**a**, **b**, **c**, **e**), Martha Lange (**d**, **f**) e Felipe Franco Curcio (**g**, **h**).

Figura 15. Localidades e espécies de *Enyalius* amostradas nesse trabalho. 1- Aripuanã, MT. 2- Juruena, MT. 3- Apiacás, MT. 4- Claudia, MT. 5- Pacoti, CE. 6- Parque das Dunas, Natal, RN. 7- Santo Agostinho, PE. 8- São José da Laje, AL. 9- Ibatiguara, AL. 10- Serra das Confusões, PI. 11- Serra da Jibóia, BA. 12- Mucugê, BA. 13- Itacarê, BA. 14- Parque Estadual Serra de Conduru, Uruçuca, BA. 15- Centro Experimental Almada, Ilhéus, BA. 16- Serra do Teimoso, Jussari, BA. 17- Una, BA. 18- Brasília, DF. 19- Luiziania, GO. 20- Almenara, MG. 21- Porto Seguro, BA. 22- Leme do Prado, MG. 23- Pote, MG. 24- Reserva da Companhia da Vale do Rio Doce, Linhares, ES. 25- Santa Teresa, ES. 26- Nova Ponte, MG. 27- Belo Horizonte, MG. 28- Mariana, MG. 29- Vale Verde, Parque Nacional do Caparaó, MG. 30- Pedra Roxa, Parque Nacional do Caparaó, ES. 31- Parque Estadual Nova Baden, Lambari, MG. 32- Pirajú, SP. 33- Pilar do Sul, SP. 34- Tapiraí, SP. 35- Piedade, SP. 36- Caucaia do Alto, SP. 37- Juquitiba, SP. 38- Serra da Cantareira, SP. 39- São Bernardo do Campo, SP. 40- Piaçaguera, Santos, SP. 41- Estação Biológica Alto da Serra, Paranapiacaba, SP. 42- Biritiba-Mirim, SP. 43- Estação Biológica de Boracéia, Salesópolis, SP. 44- Paraitinga, SP. 45- Juréia, SP. 46- Pinhalão, PR. 47- Wenceslau Brás, PR. 48- Ortigueira, PR. 49- Luiz Alves, SC.

IV. MÉTODOS

IV. 1. ESTUDOS CITOGENÉTICOS

As preparações mitóticas dos exemplares de lagartos, para estudo de cromossomos em metáfase, foram obtidas a partir de preparação direta de medula óssea, baço, fígado, pulmão e intestino. Para as análises meióticas, procedeu-se à preparação direta de material testicular.

IV.1.1. PROCEDIMENTOS

IV.1.1.A. PREPARAÇÕES DIRETAS

Na preparação direta dos órgãos usou-se uma solução de fitohemaglutinina (BAKER e col., 1971) à temperatura ambiente para estimular a divisão celular. Esta foi injetada intraperitonealmente, na proporção de 0,1ml/10g de peso do animal, 48 horas e 24 horas antes do sacrifício. Entre 4 a 6 horas antes do sacrifício, foi injetada uma solução de colchicina 0,1% na mesma proporção acima citada.

✓ MITÓTICAS

•Médula óssea, segundo FORD e HAMERTON (1956), com modificações

- 1) Retirar os fêmures e cortar as epífises;
- 2) Lavar sucessivas vezes o canal ósseo em uma placa de Petri, utilizando uma seringa com 3 a 5ml de solução de Hanks ou salina de NaCl 0,9%;
- 3) Centrifugar o material a 1200 rpm por 10 minutos. Descartar o sobrenadante;
- 4) Adicionar de 3 a 5ml de solução hipotônica de KCl 0,075 M e incubar por cerca de 20 minutos em estufa ou banho-maria a 37°C;
- 5) Retirar da estufa ou banho-maria, adicionar 6 gotas de fixador recém-preparado e gelado (3 metanol: 1 ácido acético), homogeneizando levemente a suspensão. Esperar 5 minutos e adicionar mais 3ml de fixador. Pipetar levemente e deixar 10 minutos à temperatura ambiente;
- 6) Centrifugar a 1200 rpm durante 10 minutos. Descartar o sobrenadante;
- 7) Colocar 5ml de fixador gelado, pipetar repetidas vezes, centrifugar durante 10 minutos e desprezar o sobrenadante;

- 8) Ressuspender o material em fixador fresco por 2 ou 3 vezes, dependendo da quantidade de material;
- 9) Após a última centrifugação, desprezar o sobrenadante e adicionar fixador na proporção de cerca de 2:1 em relação à quantidade de sedimento. Homogeneizar levemente a suspensão;
- 10) Pingar 1 a 2 gotas da suspensão celular sobre a superfície de uma lâmina seca, aquecida em banho-maria a 60°C, a uma distância de aproximadamente 0,5 cm. Retirar do banho-maria e secar ao ar livre.

•Baço, pulmão ou fígado, segundo YONENAGA (1972), com modificações

- 1) Colocar os órgãos em uma placa de Petri pequena contendo 3ml de solução de Hanks ou salina NaCl 0,9%;
- 2) Injetar repetidas vezes essa solução, com o auxílio de uma seringa, até que os órgãos fiquem transparentes. Desprezar os resíduos de tecido e homogeneizar bem a solução celular;
- 3) Os procedimentos seguintes são os mesmos descritos nos itens 3 a 10 da técnica de medula óssea.

•Esmagamento de intestino, segundo BOGART (1973), com modificações

- 1) Colocar o intestino em uma placa de Petri contendo água destilada gelada e lavá-lo nessa água cerca de 2 a 3 vezes;
- 2) Com uma tesoura, abrir o intestino em toda a sua extensão, cortando-o em pequenos pedaços;
- 3) Colocar os pedaços em uma placa de Petri contendo água destilada gelada por 15 minutos (hipotonização);
- 4) Retirar a água destilada e adicionar fixador recém-preparado e gelado (1 ácido acético: 1 água destilada). Deixar no fixador por, no mínimo, 15 minutos;
- 5) Com uma agulha, raspar o tecido epitelial interno dos pedaços de intestino sobre lâminas secas. Cobrir com uma lamínula e, protegendo-a com um papel absorvente, proceder ao esmagamento. Manter as lâminas já prontas em câmara úmida;
- 6) Colocar as lâminas em recipiente contendo nitrogênio líquido ou gelo seco. Deixar cerca de 4 a 6 minutos;
- 7) Retirar as lâminas do recipiente e, com o auxílio de uma gilete, desprender as lamínulas. Passar as lâminas rapidamente em álcool absoluto e deixá-las secar ao ar.

OBS: O intestino pode ser guardado para posterior esmagamento. Retirar o conteúdo alimentar. Deixar o intestino limpo em água destilada por 30 minutos e conservar em fixador (3 metanol: 1 ácido acético).

✓ **MEIÓTICAS**

•Testículos, segundo EICHER (1966), com modificações

- 1) Retirar os testículos e colocá-los em uma placa de Petri contendo cerca de 3 ml de solução de Hanks ou de NaCl 0,9%;
- 2) Separar os túbulos seminíferos da túnica albugínea com o auxílio de estiletes e, com os mesmos, procurar romper os túbulos a fim de homogeneizar o material;
- 3) Os procedimentos seguintes são os mesmos descritos nos itens 3 a 10 da técnica de medula óssea.

OBS: Assim como com o intestino, pode-se guardar o testículo para posterior esmagamento. Colocar os testículos em água destilada por 30 minutos e guardar em fixador (3 metanol: 1 ácido acético).

IV.1.B. TÉCNICAS DE COLORAÇÃO

•Coloração convencional ou comum

- 1) Hidrolisar a lâmina em HCl 1N a 60°C por 7 minutos;
- 2) Lavar com água destilada;
- 3) Corar com solução de Giemsa (Merck) diluída em tampão fosfato pH 6.8, na proporção de 1:30, respectivamente, durante 7 minutos;
- 4) Lavar com água destilada e secar.

•Coloração de regiões organizadoras de nucléolos (RONs), segundo HOWELL e BLACK (1980)

- 1) Hidrolisar as lâminas em HCl 1N a 60°C por 7 minutos. Lavar com água destilada;
- 2) Pingar uma gota de solução coloidal reveladora (1g de gelatina branca em 50ml de água destilada com 0,5ml de ácido fórmico) e duas gotas de solução de nitrato de prata (AgNO_3) 50% sobre o material da lâmina;
- 3) Colocar lamínula e incubar por 2 a 5 minutos em câmara úmida a 60°C;
- 4) Retirar a lamínula e lavar com água destilada;

- 5) Corar com solução de Giemsa (Merck) em solução tampão fosfato pH 6,8 (1:50, respectivamente), durante 20 a 30 segundos. Lavar com água destilada e secar.

IV.1.C. ANÁLISES CROMOSSÔMICAS

O número diplóide para cada exemplar foi estabelecido a partir da análise de, no mínimo, 20 metáfases. As melhores metáfases em coloração convencional e submetidas às diferentes técnicas de bandamento foram fotografadas. O microscópio óptico utilizado é um Carl Zeiss, objetiva 100 de imersão, com optovar de 1,25 e filtro verde. O filme empregado é IMAGELINK HQ (Kodak), revelado em Dektol (Kodak) diluído em água na proporção de 1:4, a 18°C por 6 minutos e fixador por 12 minutos.

As cópias feitas em papel Kodabrome Print RC F-3 (Kodak), com revelador Dektol diluído em água (1:4). A partir das fotos foram geradas as pranchas e estas fotografadas com filme Tmax, ASA 100 (Kodak), e reveladas com D-76 (Kodak) diluído em água na proporção de 1:1, a 18° por 14,5 minutos e fixador (Kodak), 12 minutos.

Os critérios utilizados para a montagem dos cariótipos foram a morfologia e o tamanho dos cromossomos, organizados aos pares em ordem decrescente de tamanho.

Preparações meióticas também foram analisadas ao microscópio óptico e as diferentes fases da meiose fotografadas.

IV. 2. ESTUDOS MOLECULARES

IV. 2.1. PROCEDIMENTOS

O DNA genômico total foi extraído de amostras de fígado ou músculo armazenados em ultrafreezer à -70°C ou etanol absoluto (protocolo de FETZNER, 1999). As pinças e tesouras utilizadas para retirar alíquotas de tecido eram esterilizadas em formol entre um exemplar e outro. Todo o manuseio foi feito com luvas cirúrgicas descartáveis e o material plástico e soluções submetidos à esterilização em autoclave e luz ultravioleta em forno UV (Spectrolinker XL-1000 UV Crosslinker- Spectronics Corporation). Tanto para a purificação do produto amplificado como para a purificação do produto da reação de sequenciamento existem dois procedimentos diferentes, ambos realizados com sucesso.

IV. 2.1.a. Extração de DNA

•Tecidos em etanol

Retirar uma parte do material e secar com uma toalha de papel. Colocar o tecido em um tubo de 1,5 ml e centrifugar por 5 minutos em centrifuga a vácuo ou deixá-lo por 10 minutos em uma bomba de vácuo, até ficar bem seco. Proceder à lise celular.

•Tecidos congelados em N₂ líquido

Retirar uma parte do material e colocar em um tubo de 1,5 ml. Proceder à lise celular.

•Lise celular

- 1) Adicionar de 300 a 900 µl da solução de lise celular (proporcional à quantidade de material). “Triturar” o tecido com um pistilo;
- 2) Adicionar de 3 a 9 µl de Proteinase-K (20 mg/ml) (proporcional à quantidade de solução de lise). Misturar invertendo o tubo várias vezes. Incubar em estufa a 55°C por algumas horas ou por toda a noite, até o tecido dissolver completamente. Seguir com o tratamento com RNase (10 mg/ml).

•Tratamento com RNase

- 1) Adicionar 4 µl de RNase (10 mg/ml);
- 2) Misturar invertendo algumas vezes o tubo e incubar em banho-maria a 37°C por 60 minutos. Retirar da estufa e deixar uns 20 minutos à temperatura ambiente. Proceder à precipitação das proteínas.

•Precipitação das proteínas

- 1) Adicionar 300 µl de Acetato de amônio;
- 2) Misturar vigorosamente (vortex) por cerca de 20 segundos. Incubar no gelo por 30 minutos;
- 3) Centrifugar por 3 minutos em ultracentrífuga para a precipitação das proteínas, RNAs, e outras moléculas. Retirar a suspensão contendo o DNA e transferir para um tubo de 2,0 ml. Descartar o pellet. Prosseguir com a precipitação do DNA. Se após a centrifugação, não se formar um pellet adequado, transferir o sobrenadante para um novo tubo e repetir os passos 2 e 3.

•Precipitação do DNA

- 1) Adicionar de 300 a 900 µl de isopropanol (proporcional à quantidade utilizada de solução de lise celular). Misturar invertendo várias vezes. Deixar por toda a noite no freezer a -20°C;
- 2) No dia seguinte, centrifugar por 6 minutos a 14.000 rpm;
- 3) Retirar o sobrenadante com muito cuidado. Inverter os tubos em cima de um pedaço de papel higiênico;
- 4) Acrescentar 900 µl de etanol 70% e inverter várias vezes para lavar o DNA;
- 5) Centrifugar por 3 minutos a 14.000 rpm. Retirar com cuidado o sobrenadante. Inverter os tubos em papel higiênico;
- 6) Colocar as amostras na centrífuga a vácuo por 20 minutos. É essencial que o pellet esteja seco; se depois desse período ainda permanecer etanol, volte a utilizar a centrífuga a vácuo. Proceder à hidratação.

•Hidratação do DNA

- 1) Adicionar de 25 a 200 µl de tampão TLE, dependendo do tamanho do pellet;
- 2) Deixar à temperatura ambiente até o dia seguinte;
- 3) No dia seguinte, guardar o DNA em geladeira (2-8°C) ou no freezer (-20°C).

•Verificação em gel de agarose da presença e integridade do DNA extraído

- 1) Preparar um gel com 0,7 g de agarose + 45 ml de TAE (1X);
- 2) Preparar as amostras utilizando 2 µl de DNA + 1,0 µl de corante blue juice. Usar como marcador o 100 bp DNA (DNA de fago lambda de concentração conhecida).

•Quantificação do DNA em espectrofotômetro (Ultrospec 1000- Pharmacia Biotech)

- 1) Em um tubo de 1,5 ml, misturar 248 µl de H₂O miliq. com 2 µl do DNA extraído. Misturar bem;
- 2) Calibrar o espectrofotômetro com 250 µl de H₂O miliq.;
- 3) A cada medição, lavar bem a cubeta.

Para obter a concentração de DNA, proceder aos seguintes cálculos:

$$X = \frac{Y + 0,0070}{0,0302}$$

onde,

X= quantidade de DNA na cubeta

Y= absorvância (obtida no espectrofotômetro)

Como na cubeta foi colocado 248 µl de H₂O miliq. e 2 µl de DNA, deve-se multiplicar o valor de X por 250 (V_{total}) e dividir por 2 (V_{dna}). Isto é:

$$\text{Concentração de DNA (ng/µl)} = \frac{X \times 250}{2}$$

Após a verificação da concentração do DNA extraído, proceder à sua diluição para obtenção de concentrações entre 20 ng/µl e 40 ng/µl. Estas são as utilizadas nos procedimentos de amplificação.

IV.2.1.b. Amplificação das regiões gênicas

•Termociclador: GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)

Verificar a cada início da utilização do termociclador, se o programa contendo as condições de temperatura e tempo é o desejado para aquele procedimento. Manter sempre os produtos e as soluções que estão sendo usadas em gelo.

•Solução de amplificação

Utilizar concentrações de DNA de 20 ng/µl a 40 ng/µl. Abaixo estão os produtos e as concentrações dos mesmos para cada reação de amplificação de 25 µl.

- DNA = 1,0 µl
- DNTPs (5 mM) = 4,0 µl
- Tampão (10X) = 2,5 µl
- Mg (25mM) = 2,5 µl
- Primers (10 µlM) cadeia leve = 2,0 µl
- Primers (10 µlM) cadeia pesada = 2,0 µl
- Taq polimerase (2,5U) = 0,5 µl
- H₂O miliq. = 10,5 µl

OBS: No caso da solução para amplificação do gene da ND4 foi utilizado 1,5 µl de Mg, pois com 2,5 µl, bandas múltiplas eram amplificadas.

•Verificação dos produtos de amplificação em gel de agarose

- 1) Preparar um gel com 0,7 g de agarose + 45 ml de TAE (1X);
- 2) Preparar as amostras utilizando 2 µl do produto de PCR + 0,7 µl de corante blue juice. Usar um marcador (100 bp DNA ou Low mass) para verificar se o produto amplificado

corresponde ao tamanho do fragmento da região que se deseja amplificar. Analisar e fotografar o gel.

•Purificação do produto amplificado (Kit de purificação Geneclean® da Bio 101)

- 1) Transferir os produtos de PCR para tubos de 2 ml;
- 2) Adicionar 250 µl de NaI e 3 µl de Glassmilk. Misturar suavemente por 30 minutos;
- 3) Centrifugar por 10 segundos;
- 4) Desprezar o sobrenadante e adicionar 250 µl de New Wash (mantê-la no gelo);
- 5) Centrifugar por 10 segundos;
- 6) Repetir procedimentos 4 e 5 por mais duas vezes;
- 7) Adicionar H₂O miliq. Para PCRs fracos de 7-8 µl de H₂O miliq. e para bons PCRs, máximo de 20 µl;
- 8) Deixar os tubos à 58°C por 10 minutos;
- 9) Centrifugar por 10 segundos. Retirar com cuidado o sobrenadante. Proceder à reação de seqüenciamento.

•Purificação do produto amplificado (Kit ExoSAP™ da USB Corporation)

- 1) Adicionar 2 µl de ExoSAP para 5 µl de PCR. Manter em gelo;
 - 2) Colocar a solução na máquina de PCR.
- (condições do termociclador: 37°C por 40 minutos e 80°C por 15 minutos)

•Reação de seqüenciamento

Para cada exemplar, são necessárias duas preparações distintas, uma para a cadeia leve e a outra para a cadeia pesada. Abaixo estão os produtos e as concentrações dos mesmos para cada reação de seqüenciamento de 5 µl.

-2,0 µl primer 5 µM

-1,0 µl do produto de PCR purificado

-2,0 µl de Big Dye

(condições do termociclador: 25 ciclos: 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos)

•Purificação dos produtos da reação de sequenciamento (colunas de sephadex)

- 1) Fazer colunas com 800 µl de sephadex, poucos minutos antes de usá-las;
- 2) Centrifugar a 4.000 rpm por 4 minutos;

- 3) Aos produtos de sequenciamento, adicionar 10 µl de H₂O miliq.;
- 4) Aplicar os produtos na coluna pelo centro, utilizando tubos de 1,5 ml devidamente identificados (cadeia leve e pesada por indivíduo);
- 5) Centrifugar as colunas a 4.000 rpm por 4 minutos;
- 6) Desprezar o conteúdo das colunas. O DNA estará no tubo de 1,5 ml;
- 7) Secar em centrífuga a vácuo por 15 minutos ou em banho-seco a 90°C por aproximadamente 2 minutos. As amostras estão prontas para leitura no sequenciador automático. Mantê-las a -20°C no escuro.

•Purificação dos produtos da reação de sequenciamento (isopropanol/etanol)

- 1) Adicionar 80 µl de isopropanol 75%. Misturar vigorosamente (vortex);
- 2) Deixar 20 minutos a temperatura ambiente;
- 3) Centrifugar 25 minutos a 13.000 rpm. Retirar o isopropanol;
- 4) Adicionar 200 µl de etanol 70%. Misturar vigorosamente (vortex);
- 5) Centrifugar 10 minutos a 13.000 rpm;
- 6) Retirar o etanol secar a 95°C por 2 minutos.

As amostras estão prontas para leitura no sequenciador automático. Mantê-las a -20°C no escuro.

•Sequenciador automático: ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer de 96 capilares (Applied Biosystems)

As reações de sequenciamento purificadas foram sequenciadas pela equipe técnica do Departamento de Botânica (IB-USP).

IV.2.1.c. Obtenção e análise das seqüências

Foram amplificados fragmentos de três diferentes regiões gênicas do DNA mitocondrial (ND4, citocromo *b* e 16S) e uma do genoma nuclear (*c-mos*), com os primers e condições de amplificação listados na Tabela 6.

Após o sequenciamento, resultam dois tipos de arquivos: um contendo as seqüências e outro com o eletroferograma (representação gráfica do sinal cromatográfico gerado pela passagem de cada nucleotídeo pelo detector cromatográfico do sequenciador). Para cada exemplar, foram obtidas as seqüências da cadeia leve e pesada. Com base na comparação dos eletroferogramas dessas duas cadeias, feita no programa ABI PRISM Sequence Navigator

(versão 1.0.1- Perkin-Elmer), foi determinada com confiabilidade a sequência de nucleotídeos. Para confirmar se a sequência obtida se tratava realmente daquela do gene desejado, foi feita uma busca comparativa no GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando o comando BLAST. A seguir as sequências foram alinhadas manualmente. No caso do gene ribossomal 16S, o alinhamento foi feito com base na estrutura secundária (BURK e col. 2002). O alinhamento das sequências foi realizado no programa SeAl (RAMBAUT 1996). Neste programa é possível se verificar o quadro de leitura através da tradução dos códons das sequências codificadoras, o que possibilita a detecção de erros. Nesses casos, as sequências e os alinhamentos eram novamente checados. A matriz revisada foi então exportada para o formato NEXUS, utilizado nos distintos programas de reconstrução filogenética, e para o formato MEGA. Para verificar a ocorrência de saturação nos genes, isto é, se ocorreu mais de uma substituição em determinados sítios, foi utilizado o programa DAMBE (XIA e XIE, 2001). Neste programa é possível se construir gráficos mostrando a quantidade de transições (TS) e transversões (TV) com relação à divergência entre os táxons.

IV. 2.1.d. Análises filogenéticas

As análises filogenéticas foram realizadas inicialmente com as regiões gênicas separadas (partições) e, em seguida, com estas sequências concatenadas, de duas formas: 1) os três genes mitocondriais (ND4+cyt *b*+16S), e 2) os quatro genes (ND4+cyt *b*+16S+c-*mos*). As lacunas (*gaps*) foram tratadas como 5º estado no caso das análises envolvendo a região do gene 16S.

Sempre quando possível, foram amplificados de três a cinco representantes de cada população. *Urostrophus vautieri*, *Anisolepis grilli* e *A. longicauda*, pertencentes ao grupo irmão de *Enyalius* foram utilizadas como grupo externo.

Nem todos os exemplares foram utilizados nas reconstruções filogenéticas. Para a escolha de quais táxons seriam usados foi utilizado o programa de computador TCS (CLEMENT e col., 2000). O programa TCS baseia-se no algoritmo de TEMPLETON e col. (1992), o qual permite que filogenias gênicas sejam estimadas de um modo mais preciso quando existem baixos níveis de divergência nas sequências de DNA. Por esse método, os haplótipos estimados de estarem relacionados numa probabilidade maior ou igual a 95% são representados numa rede. Utilizou-se essa abordagem para investigar as relações entre os haplótipos mais próximos entre si com base nas sequências do ND4 de *Enyalius*. Analisando as redes obtidas dentro do limite estatístico de confiança ($\geq 95\%$), somente alguns dos

haplótipos representativos de cada uma delas foram mantidos para as análises filogenéticas subsequentes.

As análises sob o critério de otimização da máxima parcimônia (MP) e máxima verossimilhança (MV) foram implementadas no programa PAUP* (versão 4.0b10, SWOFFORD, 2003), utilizando busca heurística (adição de passos - *stepwise addition*), devido ao grande número de táxons, com o algoritmo de rearranjo de ramos do tipo TBR (*tree bisection and reconnection*), com diferentes números de réplicas para cada caso. A inferência bayesiana (MB) foi realizada no programa MrBAYES (RONQUIST e HUELSENBECK, 2003). As quatro cadeias markovianas foram configuradas para amostrar a cada 1000 em três milhões de gerações (Samplefreq=1000; Ngen=3.000.000) e duas corridas independentes foram realizadas.

A escolha dos modelos evolutivos apropriados para cada partição e para as seqüências concatenadas, foi realizada no programa MODELTEST 3.0 (POSADA e CRANDALL, 1998). Diferentes índices de suporte foram empregados, de acordo com a análise, a fim de verificar a robustez dos agrupamentos recuperados nas topologias. Valores de *bootstrap* (BS; FELSENSTEIN, 1985) foram calculados para as análises de máxima parcimônia e máxima verossimilhança utilizando o programa PAUP 4.0b10. O índice de decaimento ou índice de Bremer (BAKER e DESALLE, 1997) foi calculado para as topologias geradas por máxima parcimônia no programa TreeRot v. 2.0 (SORENSEN, 1999) e as probabilidades *a posteriori*, no caso da análise bayesiana. Valores de *bootstrap* entre 50 e 70 foram considerados fracos, entre 70 e 95 como bons e iguais ou acima de 95, fortes (HILLIS e BULL, 1993).

As porcentagens de divergências entre as seqüências foram calculadas com base nas seqüências do gene 16S. Estas porcentagens foram usadas para estimar o tempo de divergência dos táxons, seguindo as taxas de evolução do DNAm consideradas para répteis Squamata que variam de 0,47% a 1,32% por milhão de anos (ZAMUDIO e GREENE, 1997). Nós usamos a menor taxa, 0,47%, para estimar os tempos de divergência.

IV. 2.1.c. Produtos, condições de armazenamento e preparo de soluções e do gel de agarose

•Acetato de amônio

Crystal Reagent, A.C.S.-powder- $\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$ (F.W. 77.08)

Preparo: adicionar 150 ml de H_2O miliq. a 500 g de acetato. Acrescentar o restante da H_2O miliq. aos poucos, mantendo a solução homogênea, até completar 865 ml.

Função: precipitar proteínas e RNA.

Armazenar: temperatura ambiente.

•50X TAE

Para 1 litro:

242 g de Tris base (TRIZMA® BASE)-(SIGMA)

57,1 ml de ácido acético glacial

100 ml de solução de EDTA 0,5M*(ácido etilenodiaminotetracético)

Função: solução estoque.

Armazenar: temperatura ambiente.

***Solução de EDTA 0,5M**

Preparo (1 litro): adicionar H₂O miliq. a 186,1 g de EDTA até completar 1 litro. Ajustar pH para 8.

Função: ingrediente para a preparação do TAE.

Armazenar: geladeira (4°C).

• TAE 1x (solução de uso)

Preparo: adicionar 20 ml de TAE 50x a 980 ml de H₂O miliq.

Função: tampão para gel de eletroforese.

Armazenar: temperatura ambiente.

•Solução de TLE

Para 1 litro:

1,21 g de Tris base (10 mM)

0,0374 g de EDTA (0,1 mM)

1 litro de H₂O miliq.

Preparo: juntar os compostos com a H₂O miliq e dissolver. Ajustar pH 8. Autoclavar antes de usar.

Função: tampão para ressuspender DNA e os oligonucleotídeos iniciadores (primers).

Armazenar: temperatura ambiente.

•Solução de lise celular

Para 1 litro:

1,21 g de Tris base (10 mM)

37,4 g de EDTA (100 mM)

20 g de SDS (2%)

Preparo: Juntar os compostos com a H₂O miliq e dissolver até completar 1 litro. Ajustar pH 8. Autoclavar antes de usar.

Função: digestão de membranas celulares.

Armazenar: temperatura ambiente.

•Proteinase K

Preparo (concentração final 20 mg/ml): diluir 100mg de proteinase K em 5 ml de H₂O miliq.

Função: Digestão de proteínas.

Armazenar: -20°C (freezer).

•RNase A

Preparo (concentração final 10 mg/ml): diluir 20 mg/ml em 1,5 ml de H₂O miliq.

Função: Digestão de RNA.

Armazenar: -20°C (freezer).

•Isopropanol

Função: precipitação de DNA.

Armazenar: temperatura ambiente.

•Low DNA mass

Função: Verificar tamanho dos fragmentos resultantes da amplificação dos genes.

Armazenar: -20°C (freezer).

•Sephadex

Preparo: misturar 10 g de sephadex com 150 ml de H₂O miliq.

Função: limpeza dos produtos da reação de seqüenciamento.

Armazenar: temperatura ambiente.

•Big dye

Função: nucleotídeos marcados para utilização na reação de seqüenciamento.

Armazenar: protegido da luz a -20°C.

•Taq polimerase

Função: polimerase.

Armazenar: freezer -20°C.

•MgCl₂

Função: co-fator da polimerase.

Preparo (concentração 25 mM): Dissolver solução na concentração 50 mM em 500 µl de H₂O miliq. Misturar vigorosamente (vortex) antes e depois da diluição.

Armazenar: freezer -20°C.

•10x

Função: tampão.

Armazenar: freezer -20°C.

•DNTPs (dinucleotídeos)

Preparo: Os nucleotídeos vêm separados na concentração de 100 mM.

A solução de cada DNTP para uso deve estar na concentração de 1,25 mM.

12,5 µl de DATP

12,5 µl de DCTP

12,5 µl de DGTP

12,5 µl de DTTP

950 µl de H₂O miliq

Função: nucleotídeos utilizados na reação de amplificação.

Armazenar: freezer -20°C.

•Oligonucleotídeos iniciadores (primers)

Função: permitir a amplificação da região gênica alvo.

Solução de estoque: concentração 100 µM.

Para PCR: concentração de 10 µM.

Para sequenciamento: concentração de 5 µM.

Armazenar: freezer -20°C.

•Gel de agarose 0,8%

- 1) Adicionar 0,7 g de agarose a 45 ml de TAE 1X em um erlenmeyer;
- 2) Aquecer em forno microondas por 60 segundos ou até a agarose dissolver;
- 3) Transferir o gel líquido para um erlenmeyer separado (utilizado somente para a mistura com o brometo de etídio) e adicionar 0,8 µl de brometo de etídio. Agitar suavemente;
- 4) Colocar o gel ainda líquido no suporte da cuba de eletroforese e colocar os pentes;
- 5) Após solidificação retirar os pentes. Encher a cuba com TAE 1x até cobrir totalmente o gel.

Tabela 6. Relação das regiões gênicas, primers utilizados nas reações de amplificação e seqüenciamento, e um sumário das condições de amplificação do DNA.

Região gênica	Primer	Seqüência (5'-3')	Referência	Condições de PCR neste trabalho
DNAmt				
16S	16SF.0	CTG TTT ACC AAA AAC ATM RCC TYT AGC	Whiting e col. (2003)	94°C (40s), 50°C (40s), 72°C (40s) x 40
	16SR.0	TAG ATA GAA ACC GAC CTG GAT T		
Citocromo <i>b</i>	LGL765	GAA AAA CCA YCG TTG TWA TTC AAC T	Bickham e col. (1995)	95°C (25s), 48°C (60s), 72°C (60s) x 40
	H15149	TGC AGC CCC TCA GAA TGA TAT TTG TCC TCA		
ND4	ND4	CAC CTA TGA CTA CCA AAA GCT CAT GTA GAA GC	Arévalo e col. (1994)	94°C (40s), 45°C (45s), 72°C (40s) x 35
	Leu	CAT TAC TTT TAC TTG GAT TTG CAC CA		
Nuclear				
<i>c-mos</i>	G73	GCG GTA AAG CAG GTG AAG AAA	Saint e col. (1998)	95°C (45s), 53°C (45s), 72°C (60s) x 45
	G74	TGA GCA TCC AAA GTC TCC AAT C		
	G78	AGR GTG ATR GCA AAV GAR TAR TG		
Miosina 2	MYH2-F	GAA CAC CAG CCT CAT CAA CC	Lyons (1997)	94°C (30s), 65°C (45s), 72°C (45s) x 35
	MYH2-R	TGG TGT CCT GCT CCT TCT TC		
α -enolase	Enol-H	CCA GGC ACC CCA GTC TAC CTG GTC AAA	Friesen e col. (1997)	94°C (60s), 54-56°C (60s), 72°C (60s) x 35
	Enol-L	TGG ACT TCA AAT CCC CCG ATG ATC CCA GC		

Algumas temperaturas e tempos foram modificados com relação ao original das referências. L=cadeia leve; P=cadeia pesada; s=segundos

V. RESULTADOS

V.1. CITOGENÉTICOS

De um total de 28 exemplares de *Enyalius* analisados, foram obtidos resultados satisfatórios em 27. Destes, 21 foram utilizados nas análises moleculares e estão assinalados na Tabela 5 com um asterisco.

As espécies analisadas cromossomicamente foram *E. bilineatus* de Luziania (GO), *E. catenatus* de Ilhéus (BA), *E. iheringii* de várias localidades de São Paulo, *E. perditus* de Juquitiba (SP), *E. pictus* de Linhares (ES) e uma espécie ainda não descrita formalmente (*E. sp. n*) coletada em Mucugê (BA). Os cariótipos de *E. iheringii*, *E. bilineatus* e *E. perditus* são idênticos aos descritos anteriormente por BERTOLOTTO e col. (2002): $2n=36$ (12M+24m), composto por 12 macrocromossomos e 24 microcromossomos (Figuras 16 **a**, **c** e **d**). O cariótipo de *E. pictus* também apresenta $2n=36$, com 12M+24m (Figura 17 **a**). Os pares de macrocromossomos 2 e 6 destas espécies são submetacêntricos, enquanto os demais são metacêntricos. Os microcromossomos são de difícil definição morfológica, parecendo, na maioria das vezes, acrocêntricos. Entretanto, os exemplares de *E. catenatus* têm um cariótipo distinto com $2n=38$, formado por 14 macrocromossomos e 24 microcromossomos (Figura 17 **c**). Os pares 1, 3 e 4 são metacêntricos, o par 2 é submetacêntrico e os pares 5, 6 e 7 acrocêntricos (Figura 17 **c**). Todas estas espécies têm as regiões organizadoras de nucléolos (RONs) na região distal do braço longo do par 2 (Figuras 18 **a**, **b**, **c** e **d**).

A espécie nova, *E. sp. n*, apresenta um cariótipo inusitado para o gênero, com 22 macrocromossomos acrocêntricos e 24 microcromossomos ($2n=46$, 22M+24m) (Figura 17 **d**). As RONs ocorrem na região distal do cromossomo 1 (Figura 18 **e**), que corresponde ao braço longo do par 2 das outras espécies. Análises realizadas em material meiótico revelaram 23 cromossomos em metáfase II (Figura 19 **a**) e 23 bivalentes (11 macrobivalentes e 12 microbivalentes) em células diplotênicas (Figura 19 **b**). A presença de um microbivalente heteromórfico (Figura 19 **b**) permitiu a identificação de um mecanismo cromossômico de determinação do sexo do tipo XX:XY nesta nova espécie.

Nas figuras 16 e 17 estão também os cariótipos de exemplares de *E. leechii* de Mato Grosso e do exemplar de *E. bibroni* proveniente da Serra da Jibóia (BA). O par 6 acrocêntrico em *E. bibroni* e submetacêntrico nas demais espécies pode ser explicado por um evento de inversão pericêntrica. Os pares acrocêntricos 6 e 7 de *E. catenatus*, por sua vez, estão envolvidos em rearranjos do tipo fissão/fusão, provavelmente envolvendo o par 5 de *E. bibroni*. Já o cariótipo da espécie nova com $2n=46$ deve ter se originado a partir de rearranjos

do tipo fissão/fusão cêntrica e uma inversão pericêntrica envolvendo todo o lote de macrocromossomos.

E. bilineatus, *E. leechii* e *E. perditus* têm determinação cromossômica do sexo do tipo XX:XY (Figuras 16 **b**, **c** e **d**). Os resultados citogenéticos para *E. pictus* e a espécie nova de Mucugê (BA) são inéditos.

Figura 16. Cariótipos em coloração convencional de *Enyalius*, todos com $2n=36$ (12M+24m). **a)** *E. iheringii* (Paraitinga, SP). **b)** *E. leechii* (Apiacás, MT). **c)** *E. bilineatus* (Nova Ponte, MG). **d)** *E. perditus* (Juquitiba, SP). Notar a presença de cromossomos sexuais heteromórficos em **b**, **c** e **d** e de constrição secundária distal no par 2 em **c**.

Figura 17. Cariótipos em coloração convencional de *Enyalius*. **a)** *E. pictus* de Linhares (ES), $2n=36$ (12M+24m). **b)** *E. bibroni* da Serra da Jibóia (BA), $2n=36$ (12M+24m). **c)** *E. catenatus* de Ilhéus (BA), $2n=38$ (14M+24m). **d)** *E. sp. n.* de Mucugê (BA), $2n=46$ (22M+24m). Notar a presença de cromossomos sexuais heteromórficos em **d** e de constrição secundária distal no par 2 em **b** e **c**.

Figura 18. Localização das regiões organizadoras de nucléolos (RONs) evidenciadas por coloração com nitrato de prata em *Enyalius*. **a)** *E. bilineatus*. **b)** *E. iheringii*. **c)** *E. leechii*. **d)** *E. perditus*. **e)** *E. sp. n.* Em **a**, **b**, **c** e **d**, as RONs estão localizadas na região distal do par 2 e em **e**, na região distal do par 1 (setas).

Figura 19. Células meióticas de *E. sp. n.* a) Metáfase II ($n=23$), com 11 macrocromossomos e 12 microcromossomos. b) Metáfase I, com 11 macrobivalentes e 12 microbivalentes. Notar a presença do par sexual heteromórfico XY (seta).

V.2. MOLECULARES

V.2.1. Sequências do DNA mitocondrial e nuclear

Foi extraído DNA de um total de 116 espécimes. O DNA desses exemplares foi submetido à amplificação de regiões do DNA mitocondrial (DNAMt), incluindo fragmentos do citocromo *b* (cyt *b*), da subunidade 4 da NADH desidrogenase (ND4) e do RNA ribossômico (RNAr) 16S, e de regiões dos genes nucleares *c-mos*, *RAG-1*, da miosina e da α -enolase.

Como resultado dessas amplificações, foram obtidas sequências para regiões do gene do citocromo *b* para 106 exemplares, do gene da NADH desidrogenase para 106, do gene do RNAr 16S para 68 e do gene nuclear *c-mos* para 49 exemplares. No caso dos genes nucleares, um número muito reduzido de sequências dos genes para a miosina e α -enolase foi obtido, mesmo após várias tentativas modificando as concentrações de DNA, concentração dos reagentes e temperaturas de anelamento durante as reações de PCR. Para o *RAG-1*, nenhuma sequência foi obtida (amplificação de bandas múltiplas). Portanto, somente as sequências nucleares do *c-mos*, que foram obtidas para um número significativo de exemplares, foram incluídas nas análises. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) utilizados encontram-se na Tabela 6 do capítulo “Métodos”. Na figura 20 está localizada a região de cada gene que foi amplificada com sucesso e utilizada nas matrizes submetidas às análises filogenéticas. As sequências obtidas e os alinhamentos estão disponíveis diretamente com o autor (caroevb@usp.br).

Gene ND4 (668 pb)

Gene Citocromo *b* (417 pb)

Gene 16S (538 pb)

Gene *c-mos* (523 pb)

Figura 20. Genes utilizados com a localização das regiões amplificadas (intervalo entre as setas). Entre parêntesis a quantidade de bases consideradas nas análises de cada região gênica.

O grau de saturação foi verificado em todos os genes. As curvas de substituição evidenciaram saturação para os genes *cyt b*, ND4 e 16S e não-saturação para o gene *c-mos* (Figura 21). Repetimos a construção dos gráficos utilizando distintos modelos de distância e os resultados obtidos foram os mesmos.

Figura 21. Gráficos de substituição para as regiões gênicas analisadas. Curva das transições em azul (s) e das transversões em verde (v). O modelo utilizado para o cálculo das distâncias foi o F84.

V.2. Reconstruções filogenéticas

Nem todos os exemplares foram utilizados nas reconstruções filogenéticas finais. A matriz das seqüências do ND4, que se mostrou como a região gênica mais variável entre os táxons, foi utilizada como parâmetro para a retirada dos exemplares que compartilhavam os mesmos haplótipos (em algumas populações todos ou alguns exemplares tinham o mesmo haplótipo). Após a retirada dessas seqüências idênticas, essa matriz foi analisada no programa TCS (CLEMENT e col., 2000) para a seleção dos exemplares utilizados nas reconstruções filogenéticas finais. Os exemplares de *E. iheringii* do norte do Paraná tinham haplótipos

semelhantes aos de São Paulo e foram retirados das análises. Em cada uma das análises (dos genes separados e concatenados) o número de exemplares foi distinto devido a uma seleção prévia dos exemplares representativos para não aumentar muito o tempo computacional.

Reconstruções filogenéticas a partir dos critérios de máxima parcimônia (MP) e inferência bayesiana (MB) foram realizadas inicialmente nos genes separadamente. As topologias recuperadas para cada região gênica foram então comparadas entre si com objetivo de identificar possível conflito, segundo a avaliação qualitativa sugerida por WIENS (1998). Na ausência de nodos mutuamente incompatíveis com valores de *bootstrap* altos presentes em topologias derivadas de diferentes conjuntos de dados, a metodologia de WIENS (1998) sugere que não há conflito e recomenda que as seqüências sejam combinadas para uma análise simultânea. Isto parece propiciar que regiões que compartilham uma história filogenética comum em diferentes porções do genoma sejam corroboradas por um número máximo de caracteres, além de favorecer que o sinal filogenético muitas vezes obscurecido em análises individuais seja "ativado" numa análise combinada.

Na ausência de conflito entre as diferentes topologias obtidas procedeu-se com a análise das seqüências concatenadas de duas formas: 1) só os genes mitocondriais e 2) DNAm t mais o nuclear (*c-mos*), implementando os critérios de MP, MV e MB. Em todas as análises foram incluídos três táxons como grupo externo: *Urostrophus vautieri*, *Anisolepis grilli* e *A. longicauda*.

A matriz da região do gene para o *cyt b* possui 417 caracteres, a do gene para a ND4 contem 668 caracteres, a do 16S, 538 e a do *c-mos*, 523 caracteres. A matriz concatenada dos genes mitocondriais possui 1623 caracteres e a concatenada de todos os genes, 2146 caracteres.

Valores de *bootstrap* (para MP e MV), de probabilidade *a posteriori* (PP) e o índice de Bremer (para MP) foram obtidos para os diferentes dados separados e concatenados.

Os tempos estimados de divergência dos clados, com taxas de cerca 0,47% por milhão de anos (ZAMUDIO e GREENE, 1997), foram calculados com base no gene 16S e são mostrados no filograma de máxima verossimilhança da análise concatenada de todos os genes (Figura 37).

Estudos morfológicos preliminares realizados por RODRIGUES (comunicação pessoal), mostram que: o exemplar de Pernambuco (cate PE1) e aqueles provenientes do Rio Grande do Norte (cate RN1 e cate RN2), a princípio identificados como *E. catenatus*, tratam-se de espécimes de *E. bibroni*; os exemplares de Alagoas, também identificados como *E. catenatus* (cate AL1 e cate AL2), são morfológicamente distintos aos demais *E. catenatus* (exemplares da Bahia), representando provavelmente uma espécie nova; o exemplar de *E.*

bibroni da Bahia (bibr BA1) também mostra diferenças morfológicas, sugerindo ser uma espécie nova. A nomenclatura inicial foi mantida a fim de verificar o posicionamento desses exemplares nas topologias das reconstruções filogenéticas moleculares. Estes exemplares estão referidos no texto com o nome da espécie inicialmente identificada entre aspas.

V.2.a. Máxima Parcimônia (MP)

Foram feitas reconstruções filogenéticas pelo método de MP, a partir da análise separada dos genes (*cyt b*, ND4, 16S e *c-mos*) e também das seqüências concatenadas dos três genes mitocondriais (*cyt b*, ND4, 16S) e destes com o gene nuclear *c-mos*.

A matriz do gene para o *cyt b* com 417 caracteres, apresentou 191 sítios variáveis e, destes, 159 foram informativos. A matriz do gene para a ND4 contém 668 caracteres, dos quais 337 foram variáveis e 285 informativos. A matriz do 16S com 538 caracteres, mostrou 143 variáveis e 111 informativos. Assim, a matriz das seqüências concatenadas dos genes mitocondriais totalizou 1623 caracteres, com 671 sítios variáveis e 559 sítios informativos. A matriz do gene nuclear *c-mos* com 523 caracteres, apresentou 39 sítios variáveis, sendo 24 informativos. A matriz final das seqüências concatenadas de todos os genes totalizou 2146 caracteres, dos quais 714 eram variáveis e 574 informativos para o critério da máxima parcimônia.

Todas as árvores foram enraizadas utilizando os três grupos externos listados na Tabela 5. Os caracteres foram tratados como não ordenados e com pesos iguais. Todas as buscas foram do tipo heurística por adição de passos, com o algoritmo TBR. Os valores de *bootstrap* (BS) e o índice de Bremer ou de decaimento (IB) foram estimados para os clados de todas as árvores. Valores de *bootstrap* abaixo de 50 não foram mostrados nas respectivas topologias.

As árvores de consenso obtidas para os quatro genes separados estão apresentadas nas figuras 22, 23, 24 e 25 e as reconstruções filogenéticas utilizando as matrizes concatenadas das seqüências, nas figuras 26 e 27.

Figura 22. Reconstrução filogenética com base na sequência do gene da ND4 de 45 exemplares de *Enyalius* a partir do método de MP: consenso das seis árvores mais parcimoniosas (1188 passos, índice de consistência=0,436, índice de retenção=0,793) com 5000 réplicas. Os números acima dos ramos correspondem aos valores de *bootstrap* (1000 réplicas) e aqueles abaixo, aos índices de Bremer. As siglas dos exemplares e localidades estão na Tabela 5 do capítulo “Material”.

Figura 23. Reconstrução filogenética com base na sequência do gene do citocromo *b* de 48 exemplares de *Enyalius* a partir do método de MP: consenso das 16 árvores mais parcimoniosas (741 passos, índice de consistência=0,378; índice de retenção=0,777) com 5000 réplicas. Os números acima dos ramos correspondem aos valores de *bootstrap* (1000 réplicas) e aqueles abaixo, aos índices de Bremer.

Figura 24. Reconstrução filogenética com base na sequência do gene do RNAr 16S de 38 exemplares de *Enyalius* a partir do método de MP: consenso das 2400 árvores mais parcimoniosas (373 passos, índice de consistência=0,563; índice de retenção=0,831) com 5000 réplicas. Os números acima dos ramos correspondem aos valores de *bootstrap* (1000 réplicas) e aqueles abaixo, aos índices de Bremer.

Figura 25. Reconstrução filogenética com base na sequência do gene nuclear *c-mos* de 19 exemplares de *Enyalius* a partir do método de MP: consenso das 26 árvores mais parcimoniosas (48 passos, índice de consistência=0,875; índice de retenção=0,910) com 5000 réplicas. Os números acima dos ramos correspondem aos valores de *bootstrap* (1000 réplicas) e aqueles abaixo, aos índices de Bremer.

Figura 26. Reconstrução filogenética com base nas seqüências dos três genes mitocondriais concatenadas (1.623 caracteres) de 49 exemplares de *Enyalius* a partir do método de MP: consenso das quatro árvores mais parcimoniosas (2317 passos, índice de consistência=0,435; índice de retenção=0,806) com 10.000 réplicas. Os números acima dos ramos correspondem aos valores de *bootstrap* (10.000 réplicas) e aqueles abaixo, aos índices de Bremer.

Figura 27. Reconstrução filogenética com base nas seqüências de todos os genes (ND4, cyt *b*, 16S e *c-mos*) concatenados (2146 caracteres) de 42 exemplares de *Enyalius* a partir do método de MP: consenso das sete árvores mais parcimoniosas (2317 passos; índice de consistência= 0,456; índice de retenção= 0,781) com 10.000 réplicas. Os números acima dos ramos correspondem aos valores de *bootstrap* (10.000 réplicas) e aqueles abaixo, aos índices de Bremer.

As árvores de consenso obtidas para os quatro genes separados não mostraram incongruências significativas (Figuras 22 a 25). As reconstruções filogenéticas utilizando as matrizes concatenadas das seqüências resultaram em topologias similares (Figuras 26 e 27).

As espécies *E. iheringii*, *E. perditus*, *E. leechii* e *E. bilineatus* mostram monofiletismo, com altos valores de suporte (BS $\geq$ 95).

O gene 16S, por apresentar taxas de evolução mais lentas quando comparado ao ND4 e ao *cyt b*, ajudou a resolver divergências mais antigas. Estes últimos foram mais úteis na resolução das relações entre os terminais.

Na maioria das topologias dois grandes clados aparecem, um deles formado pelas espécies *E. brasiliensis*, *E. iheringii* e *E. perditus* e outro pelas demais espécies. Estes clados mostraram valores maiores de suporte nas análises concatenadas e do 16S separado. No primeiro clado, as relações entre as espécies não aparecem bem resolvidas com nenhum dos genes separados nem combinados (baixos valores de BS e IB).

No segundo clado (formado por *E. leechii*, *E. bilineatus*, *E. catenatus*, *E. bibroni*, *E. pictus* e *E. sp*), *E. leechii* aparece como espécie-irmã de todas as demais espécies pertencentes ao clado (*E. bilineatus*, *E. catenatus*, *E. bibroni*, *E. pictus* e *E. sp*), com exceção dos resultados obtidos com o gene *c-mos* sozinho, onde *E. leechii* aparece inserido no outro grande clado, mas com baixo valor de BS (Figura 25). O clado formado por *E. bilineatus*, *E. catenatus*, *E. bibroni*, *E. pictus* e *E. sp* é fortemente apoiado por valores de BS=100, na maioria das análises, inclusive nas concatenadas. Dentro desse clado, foram observados três grupos de espécies com elevados valores de *bootstrap*: grupo 1, formado por *E. bibroni* e “*E. catenatus*” (BS=100 em todas as análises, com exceção do *c-mos*); grupo 2, formado por *E. bilineatus* (BS=100 nas análises concatenadas e do ND4) e o grupo 3 formado por *E. pictus*, *E. catenatus* e “*E. bibroni*” da Bahia. A espécie nova de Mucugê, *E. sp n* (sp BA1), ora aparece relacionada com o grupo 1 ora com o grupo 2, sempre com baixíssimos valores de BS e IB, portanto com relação indefinida de parentesco dentro do clado. As relações entre estes grupos também não foram estabelecidas (baixos valores de suporte). No grupo 3, o monofiletismo da espécie *E. pictus* não é observado. Já as espécies “*E. bibroni*” e *E. catenatus* da Bahia formam um subgrupo bem apoiado (BS=100 nas análises combinadas).

V.2.b. Análise Bayesiana (MB)

As inferências bayesianas foram feitas a partir dos genes separadamente e de forma concatenada. Foi selecionado para cada região gênica o modelo evolutivo mais adequado (MODELTEST 3.0). Os modelos selecionados foram:

- ND4: TVM+I+G= Modelo transversional

-considera frequência de bases diferentes, com sítios invariáveis e sítios que variam com taxas distintas.

- Cyt *b*: GTR+I+G= Modelo Geral de Reversão ao longo do tempo (TAVARÉ, 1986)

- permite que diferentes taxas de substituição de um nucleotídeo por cada um dos demais possam ser consideradas nas análises filogenéticas, levando-se em conta a frequência dos mesmos e a taxa de substituição (SWOFFORD e col, 1996)

- 16S: TrN+I+G= Modelo Tamura-Nei (TAMURA e NEI, 1993)

- considera três classes de substituição (dois tipos de transição e um de transversão), com frequências distintas para cada base, assumindo heterogeneidade de taxas de substituição entre os sítios.

- C-*mos*: K80+G= Modelo Kimura dois parâmetros (KIMURA, 1980)

- considera duas classes de substituição (transição e transversões)

As seqüências foram concatenadas de duas formas: somente os genes mitocondriais e estes com o gene nuclear. Para cada partição gênica o modelo evolutivo selecionado foi utilizado (descrito acima).

As cadeias markovianas foram configuradas para amostrar a cada 1000 árvores em três milhões de gerações (samplefreq=1000; Ngen=3000000). As gerações anteriores ao ponto de estabilidade foram descartadas (Tabela 7) (Figuras 28 e 29). As gerações restantes foram usadas para gerar a árvore de consenso pela regra da maioria dos 50%. Os valores de suporte são as probabilidades *a posteriori* dos ramos (Figuras 30 a 35).

Tabela 7. Número de gerações desconsideradas nas análises das diferentes análises.

Região gênica	Ponto de corte
ND4	15.000 gerações
cyt <i>b</i>	18.000 gerações
16S	18.000 gerações
<i>c-mos</i>	43.000 gerações
ND4 + cyt <i>b</i> + 16S	20.000 gerações
ND4 + cyt <i>b</i> + 16S + <i>c-mos</i>	15.000 gerações

Figura 28. Gráfico mostrando as mudanças das probabilidades no decorrer das gerações para os genes mitocondriais concatenados. A curva atinge a fase estacionária após, aproximadamente, 20.000 gerações.

Figura 29. Gráfico mostrando as mudanças das probabilidades no decorrer das gerações para a análise concatenada de todos os genes. A curva atinge a fase estacionária após, aproximadamente, 15.000 gerações.

Figura 30. Reconstrução filogenética com base na sequência do gene da ND4 de 45 exemplares de *Enyalius* pelo método de inferência Bayesiana: árvore de consenso pela regra da maioria de 2806 árvores amostradas em MCMC (ponto de corte: 16.000 gerações). Os valores de probabilidade *a posteriori* estão na parte superior dos ramos.

Figura 31. Reconstrução filogenética com base na sequência do gene da *cyt b* de 48 exemplares de *Enyalius* pelo método de inferência Bayesiana: árvore de consenso pela regra da maioria de 2982 árvores amostradas em MCMC (ponto de corte: 18.000 gerações). Os valores de probabilidade *a posteriori* estão na parte superior dos ramos.

Figura 32. Reconstrução filogenética com base na sequência do gene da 16S de 38 exemplares de *Enyalius* pelo método de inferência Bayesiana: árvore de consenso pela regra da maioria de 2982 árvores amostradas em MCMC (ponto de corte: 18.000 gerações). Os valores de probabilidade *a posteriori* estão na parte superior dos ramos.

Figura 33. Reconstrução filogenética com base na sequência do gene nuclear *c-mos* de 19 exemplares de *Enyalius* pelo método de inferência Bayesiana: árvore de consenso pela regra da maioria de 2957 árvores amostradas em MCMC (ponto de corte: 43.000 gerações). Os valores de probabilidade *a posteriori* estão na parte superior dos ramos.

Figura 35. Reconstrução filogenética com base na sequência concatenada de todos os genes (ND4, cyt *b*, 16S e *c-mos*) de 42 exemplares de *Enyalius* pelo método de inferência Bayesiana: árvore de consenso pela regra da maioria de 2.985 árvores amostradas em MCMC (ponto de corte: 15.000 gerações, figura 29). Os valores de probabilidade *a posteriori* estão na parte superior dos ramos.

Os resultados obtidos para os genes separados e concatenados através de inferência bayesiana foram bastante similares. Os dois grandes clados, observados nas análises de MP, foram também observados em MB, com exceção da análise separada do gene 16S na qual a espécie *E. perditus* faz parte do outro clado (Figura 32).

No clado formado por *E. brasiliensis*, *E. perditus* e *E. iheringii*, as relações entre as espécies não aparecem bem resolvidas em nenhuma das reconstruções (PP < 80). No outro grande clado (*E. leechii*, *E. bilineatus*, *E. catenatus*, *E. bibroni*, *E. pictus* e *E. sp. n*) *E. leechii* aparece como espécie-irmã das demais espécies, com exceção da reconstrução obtida com o gene *c-mos* separado. Os três grupos de espécies do clado composto *E. bilineatus*, *E. catenatus*, *E. bibroni*, *E. pictus* e *E. sp. n* mostram altos valores de probabilidades *a posteriori* (PP=100). A espécie nova, *E. sp. n*, neste método de análise, aparece associada ao grupo 1, formado por *E. bibroni* e “*E. catenatus*” (PP variando de 88 a 100, com exceção dos resultados obtidos com as análises separadas dos genes 16S e *c-mos*). O grupo 2, formado por *E. bilineatus* apresenta monofiletismo (PP=100), com exceção do observado com o gene 16S separado, em cuja análise os exemplares de *E. bilineatus* aparecem parafiléticos. Dentro do grupo 3 (*E. pictus*, *E. catenatus* e “*E. bibroni*” da Bahia), *E. pictus* não tem seu monofiletismo recuperado na maioria das reconstruções filogenéticas; “*E. bibroni*” da Bahia e *E. catenatus* aparecem como espécies irmãs (PP>90).

As análises combinadas dos genes resultaram em probabilidades *a posteriori* mais altas.

V.2.c. Máxima Verossimilhança (MV)

As análises de MV foram realizadas com as seqüências concatenadas dos genes mitocondriais e destes com o gene nuclear. As duas matrizes de seqüências concatenadas foram submetidas ao programa MODELTEST para a determinação do modelo evolutivo (abaixo). Todas as árvores foram enraizadas. As buscas foram feitas através de busca heurística por adição de passos, com algoritmo de rearranjo dos ramos do tipo TBR.

- Seqüências concatenadas dos genes mitocondriais

Modelo: GTR+I+G= Modelo Geral de Reversão ao longo do tempo (TAVARÉ, 1986)

Ln de verossimilhança: 12730.68086

Frequências estimadas das bases: A=0,36690; C=0,28560; G=0,09280; T=0,25470

Proporção de sítios invariáveis: 0,4987

Parâmetro de distribuição gama: 0,8719

- Seqüências concatenadas de todos os genes

Modelo: GTR+I+G= Modelo Geral de Reversão ao longo do tempo (TAVARÉ, 1986)

Ln de verossimilhança: 13642.30498

Frequências estimadas das bases: A=0,34150; C=0,26500; G=0,13660; T=0,25690

Proporção de sítios invariáveis: 0,5646

Parâmetro de distribuição gama: 0,8411

Figura 36. Reconstrução filogenética com base na sequência concatenada dos genes mitocondriais de 49 exemplares de *Enyalius* pelo método de máxima verossimilhança (MV): filograma da árvore mais provável (lnL: 12730.68086) com 100 réplicas. Não foram calculados os valores de *bootstrap*.

— 0.01 substitutions/site

Figura 37. Reconstrução filogenética com base nas seqüências concatenadas de todos os genes de 42 exemplares de *Enyalius* pelo método de máxima verossimilhança (MV): filograma da árvore mais provável (-lnL=13642.30498) com 100 réplicas. Valores de *bootstrap* (200 réplicas) acima dos ramos. O tempo de divergência (em vermelho) está em milhões de anos. Os grupos dentro do clado 2 estão identificados pela letra G (em azul).

As reconstruções filogenéticas obtidas por MV recuperaram os clados já observados nas análises de MP e MV. As relações de parentesco entre estes foram similares às encontradas por inferência bayesiana.

No clado formado por *E. perditus*, *E. brasiliensis* e *E. iheringii* (Figura 37: nó 17 com BS=96) as relações de parentesco não estão bem resolvidas (nó 18: BS=55). No outro clado (nó 2: BS=88), *E. leechii* aparece como espécie-irmã das espécies demais espécies, que formam juntas um subclado com alto valor de *bootstrap* (nó 3: BS=100). Este subclado está dividido em três grupos: grupo formado por *E. bilineatus* (nó 12: BS=100); grupo formado por *E. bibroni*, “*E. catenatus*” e *E. sp* (nó 9: BS= 83) e o grupo formado por *E. pictus*, *E. catenatus* e “*E. bibroni*” (nó 5: BS=100). Nesse último clado, *E. pictus* não recupera seu monofiletismo.

VI. DISCUSSÃO

A hipótese filogenética proposta neste estudo para as espécies do gênero *Enyalius*, é feita com base na análise de seqüências concatenadas do DNA mitocondrial e nuclear através de diferentes métodos de reconstrução filogenética. As análises combinadas propiciaram um aumento na resolução das relações entre os clados, com aumento nos valores dos índices de suporte dos ramos, característica esta já salientada por outros autores (FLORES-VILLELA e col. 2000). Outra vantagem desse tipo de análise combinada tem sido ressaltada por alguns autores que mostram que o uso de partições independentes, com diferentes taxas de evolução, pode propiciar a complementação recíproca das informações permitindo resolver a relação entre clados em diferentes níveis hierárquicos (HILLIS, 1987; WIENS, 1998).

De acordo com as reconstruções filogenéticas neste trabalho apresentadas, existem dois grandes clados: **clado 1** (Figura 37: nó 17) composto pelas espécies *E. brasiliensis*, *E. iheringii* e *E. perditus*; **clado 2** (Figura 37: nó 2), formado pelas demais espécies.

As relações de parentesco recuperadas entre as espécies do **clado 1** foram distintas, de acordo com o método de reconstrução empregado. Na topologia de MP (Figura 27), *E. brasiliensis* aparece como grupo irmão (BS=89, IB=7) do clado, pouco apoiado, que reúne *E. iheringii* + *E. perditus* (BS=60, IB=2). Já em MV e MB, *E. brasiliensis* é recuperado como grupo irmão de *E. iheringii*, mas com fraco suporte (Figura 37: nó 18, BS=55; Figura 35: PP=79). Em ambos os métodos, *E. perditus* aparece basal ao clado *E. brasiliensis* + *E. iheringii*.

Na revisão do gênero feita por JACKSON (1978), com base em caracteres morfológicos e osteológicos, também são sugeridos esses dois clados. Um dos pontos discordantes entre a proposta do autor e a nossa é a relação próxima que JACKSON propõe entre *E. leechii* e *E. brasiliensis*, associada à presença vicariante da primeira na Amazônia que corroboraria a sugestão que *E. brasiliensis* estaria relacionada ao estoque basal de *Enyalius* na Floresta Atlântica. Contrariamente, nossos resultados mostram que *E. brasiliensis* tem relação próxima com *E. iheringii* e *E. perditus*, formando com estas duas espécies um clado bem apoiado (Figuras 27, 35 e 37: BS > 89 nas análises concatenadas de MP e MV e PP=100 em MB)

Até esse ponto do cladograma, os resultados por nós obtidos foram iguais entre os diferentes métodos de análise filogenética. Contudo existem diferenças nas reconstruções por MP com relação às obtidas por MB e MV: o posicionamento de *E. sp. n* (sp BA1), que em MB (Figura 35: PP=100) e em MV (Figura 37: nó 9, BS=83) aparece no mesmo clado de “*E. catenatus*” de Alagoas (cate AL1) e *E. bibroni* (bibr CE1, bibr PI1 e cate PE1 e cate RN1,

identificados a princípio como *E. catenatus*) ao invés de estar próximo ao clado que reúne os exemplares de *E. bilineatus* como sugerido pela análise de MP (Figura 27). Entretanto, esta relação tem pouco apoio na análise de MP (BS<50, IB=2). Outra diferença é que o subclado contendo *E. bibroni* (bibr CE1, bibr PI1, cate PE1 e cate RN1), “*E. catenatus*” de Alagoas (cate AL1) e *E. sp. n* (sp BA1) aparece como grupo irmão do subclado *E. catenatus* da Bahia (cate BA) + “*E. bibroni*” da Bahia (bibr BA1) + *E. pictus* em MB (Figura 35: PP=97) e MV (Figura 37: nó 4, BS=73), enquanto que em MP (Figura 27) este último subclado é recuperado como grupo-irmão de *E. bilineatus*, mas essa relação tem pouco suporte pelos índices de *bootstrap* e Bremer (Figura 27: BS=54 e IB=2).

Resumidamente, em vários pontos das árvores obtidas por máxima parcimônia apareceram clados com baixos valores de suporte e algumas espécies instáveis quanto ao posicionamento entre os clados. Uma das possíveis causas dessa baixa resolução de algumas relações de parentesco seja a saturação das seqüências dos genes mitocondriais, que está refletida nos baixos índices de consistência observados. Já as reconstruções a partir dos métodos de máxima verossimilhança e inferência bayesiana resultaram em topologias onde as relações de parentesco entre os clados estão melhor definidas, com valores altos dos índices de suporte dos ramos. Interessante dizer que os modelos de evolução, implementados nas análises por MV e MB, corrigem a saturação das seqüências, o que resulta numa melhor resolução das topologias. Por esses motivos, adotamos as reconstruções filogenéticas de MV e MB para interpretar as relações de parentesco entre as espécies de *Enyalius*. A topologia resultante da análise concatenada de todos os genes por MV (Figura 37) foi usada para inserir os tempos de divergência entre as espécies e os números diplóides.

Segundo a proposta filogenética adotada, no **clado 1** (Figura 37: nó 17), *E. iheringii* aparece como espécie-irmã de *E. brasiliensis* (Figura 37: nó 18), porém com valores de suporte baixos (BS=55 e PP=79). *E. iheringii* (Figura 37: nó 19) tem seu monofiletismo recuperado com valores altos de suporte nas análises concatenadas (Figura 37: BS=100; Figura 35: PP=100; Figura 27: BS=98 e IB=7). Os exemplares de São Paulo e do norte do Paraná de *E. iheringii* mostraram haplótipos bastante similares (os exemplares do PR não fizeram parte das reconstruções finais). No caso do exemplar de Santa Catarina (iher SC1), este aparece separado daqueles de SP e PR. Talvez essa população de Santa Catarina represente outra entidade taxonômica e os rios das bacias do leste tenham atuado como pontos de interrupção do fluxo gênico. Entretanto, essa hipótese precisa ser confirmada com uma amostragem mais ampla dessas populações e daqueles ao sul do Paraná..

Dentro do **clado 2**, *E. leechii* aparece como espécie-irmã do clado que contém as demais espécies (Figura 37: nó 3). O clado formado por *E. bilineatus*, *E. catenatus*, *E.*

bibroni, *E. pictus* e *E. sp. n* (Figura 37: nó 3) é fortemente apoiado pelos valores de suporte e repetibilidade (BS=100, IB>19 e PP=100, nas análises concatenadas). Dentro desse clado, foram observados três grupos de espécies com elevados valores de apoio: grupo 1 (Figura 37: nó 9), formado por *E. bibroni* (bibr CE1, bibr PI1, cate PE1 e cate RN1), “*E. catenatus*” (cate AL1) e *E. sp. n* (sp BA1), com valores de suporte de BS=100 e PP=100; grupo 2 (Figura 37: nó 12), formado por *E. bilineatus* (BS=100, PP=100 e IB=27); grupo 3 (Figura 37: nó 5) formado por *E. pictus*, *E. catenatus* e “*E. bibroni*” (bibr BA1).

Na espécie amazônica, *E. leechii* (Figura 37: nó 15), o exemplar de Claudia (leec MT3), apresenta-se separado dos demais exemplares provenientes de duas localidades próximas entre si e distantes de Claudia (Figura 37: nó 15; 6,38MY). Da Floresta Amazônica, somente estudamos exemplares provenientes do estado do Mato Grosso. Morfologicamente (RODRIGUES, comunicação pessoal), os exemplares aqui estudados são bastante similares. Diante da reconstrução filogenética neste trabalho apresentada, parece sugestivo admitir que esse exemplar de Claudia possa ser uma entidade nova, distinta. Um investimento grande deve ser realizado, elevando o número de exemplares e as localidades amostradas desta espécie amplamente distribuída na Floresta Amazônica, para investigar se realmente *E. leechii* não constitui um complexo de espécies. Diferentemente do que se observa com *E. leechii*, as espécies de *Leposoma* que ocorrem na Floresta Amazônica formam um clado separado daquelas que estão na Floresta Atlântica (PELLEGRINO e col., 2005b).

Os exemplares de *E. bilineatus* formam um clado monofilético bem apoiado (Figura 37: nó 12, BS=100), porém dividido em dois subclados: um com localização mais no centro do Brasil (GO, DF, MG: bili MG1, bili MG2 e bili DF1) e outro mais próximo da costa (MG e ES: bili MG3 e bili ES1). A Serra do Espinhaço é a marca geográfica dessa divisão. Com base em caracteres morfológicos distintos entre os exemplares desses dois subclados (RODRIGUES, comunicação pessoal), o tempo de divergência estimado entre eles (Figura 37: nó 12; 7,55 MY) e a posição geográfica disjunta, sugerimos que possam tratar-se de duas espécies distintas.

Com relação ao clado do nó 10 (Figura 37), estudos morfológicos preliminares realizados por RODRIGUES (comunicação pessoal), mostram que: o exemplar de Pernambuco (cate PE1) e aqueles provenientes do Rio Grande do Norte (cate RN1 e cate RN2), a princípio identificados como *E. catenatus*, tratam-se, na verdade, de espécimes de *E. bibroni*; os exemplares de Alagoas, também identificados como *E. catenatus*, são morfológicamente distintos aos exemplares de *E. catenatus* da Bahia. Nossos resultados corroboram esses achados morfológicos e também sugerem que os exemplares de “*E. catenatus*” de Alagoas (Figura 37: cate AL1) sejam uma espécie diferente, nova, e os

exemplares cate PE1, cate RN1 e cate RN2, pertençam à espécie *E. bibroni*. Juntamente com estas espécies, faz parte do grupo 1 (Figura 37: nó 9) a nova espécie coletada em Mucugê na Bahia (sp BA1), região isolada formada por vegetação semidecídua, “carrasco”, identificada pelo Dr. Rodrigues (RODRIGUES e col., 2006).

No grupo 3 (Figura 37: nó 5), o monofiletismo da espécie *E. pictus* não é recuperado por nenhum dos métodos de reconstrução utilizado. Os exemplares desta espécie aparecem divididos em dois clados: (1) Norte de Minas Gerais e sul da Bahia (pict MG1, pict MG3 e pict BA1); (2) leste de Minas Gerais e Espírito Santo (pict MG2 e pict ES1). Já as espécies “*E. bibroni*” da Bahia (bibr BA1) e *E. catenatus* (cate BA) formam um subgrupo bem apoiado (BS=100, e PP=100, nas análises combinadas). O exemplar “*E. bibroni*” (bibr BA1), que foi coletado na Serra da Jibóia, um enclave de área florestada na Caatinga, deve ser uma espécie nova, segundo sugerem os dados morfológicos e moleculares obtidos no presente trabalho.

As informações retiradas com base nas reconstruções apresentadas, juntamente com a distribuição atualmente conhecida para o gênero e os estudos morfológicos em andamento (Rodrigues, comunicação pessoal) mostram pontos divergentes importantes em relação à hipótese das relações de parentesco em *Enyalius* propostas por JACKSON (1978). Este autor sugere que *E. bilineatus* e *E. bibroni* seriam as espécies mais derivadas do clado 2 e que *E. bilineatus* teria um ancestral comum com *E. bibroni* ou *E. pictus*. Contrariamente a essas suposições do autor, as espécies *E. catenatus* e *E. pictus* é que apresentam origem mais recente (Figura 37: cerca de 2,76 milhões de anos para “*E. bibroni*” da Serra da Jibóia, bibr BA1, e a 0,60 MY para *E. catenatus*;) e *E. bilineatus* não compartilha relação de parentesco próxima com nenhuma dessas duas espécies.

Com relação à distribuição das espécies ao longo da Floresta Atlântica e as relações filogenéticas aqui apresentadas, o Rio Doce seria a “marca” geográfica de divisão do **clado 1** e **2**. Ao sul do Rio Doce estariam distribuídas as espécies *E. brasiliensis* (ES), *E. perditus* (SP) e *E. iheringii* (SP, PR, SC). Do norte do Rio Doce até o Rio Jequitinhonha ocorreria a espécie *E. pictus* (ES e MG). Do norte do Rio Jequitinhonha ao sul do Rio São Francisco estaria *E. catenatus*. A partir desse último rio em direção ao norte, parece existir uma espécie diferente em Alagoas, a princípio descrita como *E. catenatus* (Figura 37: cate AL1). Mais ao norte do país, ocorreria *E. bibroni* (PE, RN, CE e PI). O exemplar de *E. bibroni* proveniente da Serra da Jibóia (bibr BA1), enclave de mata na Caatinga, provavelmente representa uma nova espécie.

JACKSON já chamara a atenção para os rios que ocorrem ao longo da distribuição do gênero *Enyalius*, ressaltando o papel do Rio Doce. Através de sua descrição dos eventos de isolamento e especiação, o autor também cita os rios Paraíba, Jequitinhonha e São Francisco.

Em um estudo molecular recente em lagartos do gênero *Gymnodactylus* foi verificada uma coincidência entre o padrão de estruturação genética de três filogrupos do DNAmT e a presença dos principais rios das bacias da costa leste brasileira. Os autores sugerem que os rios da bacia da costa Atlântica brasileira funcionem como potenciais barreiras para a especiação (PELLEGRINO e col., 2005a).

Segundo a estimativa preliminar dos tempos de divergência propostos neste trabalho, o gênero *Enyalius* teria iniciado o processo de diversificação ao redor de 22 milhões de anos atrás e a espécie *E. catenatus* seria bastante recente (0,60 MY).

O gênero *Enyalius*, revisado por BOULENGER'S (1885), ETHERIDGE (1969) e JACKSON (1978), foi pela última vez foco de revisão em 2001 por FROST e col., como parte de um estudo mais amplo que objetivava estabelecer as relações de parentesco entre as famílias e gêneros de Iguania. FROST e col., (2001a) em seu estudo da família Iguanidae (sensu ESTES e col., 1998), obtiveram seqüências de DNA de alguns poucos exemplares de *Enyalius*, não obtendo uma resolução para as relações de parentesco dentro do gênero. Esses autores chamaram a atenção para a necessidade de mais estudos, incluindo mais localidades e exemplares, sugerindo que esse número de seis espécies proposto por JACKSON (1978) estaria subestimado, o que foi confirmado no presente estudo.

Destas revisões, a mais completa para o gênero foi feita por JACKSON em 1978, que, excetuando a espécie *E. leechii*, realizou um amplo estudo baseado em dados morfológicos e osteológicos com exemplares coletados ao longo da Floresta Atlântica e em algumas localidades mais interiorizadas. O autor delimitou as principais unidades taxonômicas existentes no leste do Brasil, propôs uma filogenia e uma seqüência alopátrida de diferenciação no gênero e ressaltou o papel dos antigos refúgios de floresta e do Rio Doce na variação da distribuição dos estados de caracteres.

Com base em suas observações, o autor propôs oito entidades fenéticas acima do nível de população: *E. bilineatus*, *E. brasiliensis brasiliensis*, *E. b. boulengeri*, *E. catenatus catenatus*, *E. c. bibroni*, *E. c. pictus*, *E. iheringii*, *E. perditus* (pela primeira vez descrita). Somadas a *E. leechii*, que ocorre na Floresta Amazônica, o gênero conteria, segundo esse estudo, seis espécies. Na filogenia por ele proposta, na qual *E. b. brasiliensis* foi considerado ancestral hipotético para o cálculo das árvores de Wagner (Figura 5 na página 13), dois grupos relativamente distintos foram identificados: um basal, composto por *E. b. brasiliensis*, *E. perditus*, *E. b. boulengeri* e *E. iheringii*, e outro derivado formado por *E. c. catenatus*, *E. c. pictus*, *E. c. bibroni* e *E. bilineatus*. No último grupo, *E. bilineatus* e *E. c. bibroni* aparecem como as espécies mais derivadas. *E. leechii* é considerada pelo autor como tendo parentesco próximo com *E. brasiliensis*. Ele sugere que a ampla distribuição alopátrida das espécies seria

resultante da inabilidade em dividir nichos e que a diferenciação não foi “conduzida” pela adaptação a novos nichos e sim, preferivelmente, devido à interrupção do fluxo gênico, uma vez que, com exceção de *E. bilineatus*, as demais espécies estão restritas a florestas.

De acordo com os resultados de reconstrução filogenética aqui descritos, o gênero *Enyalius* seria composto de pelo menos 11 espécies: *E. sp 1* (*E. bibroni* da Serra da Jibóia: bibr BA1), *E. sp 2* (*E. catenatus* de Alagoas: cate AL1 e cate AL2), *E. sp 3* (*E. sp n*: sp BA1), *E. bilineatus*, *E. catenatus*, *E. bibroni*, *E. pictus*, *E. leechii*, *E. brasiliensis*, *E. iheringii* e *E. perditus*. Se considerarmos que os exemplares de *E. bilineatus* na verdade representam duas espécies distintas, teríamos 12 espécies no gênero.

Existe uma lacuna enorme com relação às informações ecológicas das espécies de *Enyalius*, o que dificulta as interpretações do padrão de distribuição observado. Parece que as espécies desse gênero são territoriais e não adaptadas a regiões sem florestas, com exceção de *E. bilineatus* que ocorre em áreas do Cerrado. Esse aspecto ecológico nos faz pensar que os eventos de contração e expansão das florestas representariam um fator importante de isolamento e especiação, além do papel dos rios como interruptores do fluxo gênico.

Com relação aos dados cromossômicos, os cariótipos observados em exemplares de algumas espécies de *Enyalius* foram surpreendentes, revelando a ocorrência de rearranjos do tipo inversão pericêntrica e fissão/fusão cêntrica, demonstrando que o gênero não é conservado sob o ponto de vista citogenético. O cariótipo formado por 12 meta/submetacêntricos e 24 microcromossomos (12M+24m), considerado, por vários autores, o cariótipo ancestral para os iguania pleurodontes (BICKHAM 1984; GORMAN e col., 1967; PAULL e col., 1976) caracteriza as espécies *E. bilineatus*, *E. iheringii*, *E. leechii*, *E. perditus* e *E. pictus* (Figuras 16 e 17). Contudo, o exemplar da Serra da Jibóia (BA), identificado, a princípio, como *E. bibroni*, apesar de exibir $2n=36$ (12M+24m), difere dos anteriores porque o par 6 é acrocêntrico; a morfologia distinta deste par, provavelmente, é resultante de um evento de inversão pericêntrica envolvendo o par 6 do ancestral, segundo as análises moleculares aqui apresentadas. *E. catenatus* (Ilhéus, BA: cate BA1 e cate BA2), por sua vez apresenta $2n=38$, com 14 macrocromossomos: 4 pares meta/submetacêntricos e três pares acrocêntricos. Com base nas reconstruções filogenéticas sugerimos que o par 5 acrocêntrico maior corresponde ao par 6 do exemplar da Serra da Jibóia (bibr BA1), enquanto que os pares 6 e 7 corresponderiam ao par 5 metacêntrico fissionado (Figura 17). Já a espécie nova coletada em Mucugê (sp BA1), com $2n=46$ (22M+24m), não tem relação próxima com aquela da Serra da Jibóia (bibr BA1) nem com *E. catenatus*, revelando que eventos de fissão independentes originaram o cariótipo da nova espécie de Mucugê (BA).

Apesar de citogeneticamente possa parecer mais “parcimonioso” aceitar que eventos de fusão são mais viáveis, trabalhos com outros Iguana não acrodontes revelaram ser a fissão mais plausível (WEBSTER e col., 1972; HALL e SELANDER 1973).

Nossos achados citogenéticos reforçam as evidências morfológicas e moleculares que indicam que a espécie encontrada na Serra da Jibóia (BA) e em Mucugê (BA) são espécies novas.

Para uma melhor compreensão das mudanças cromossômicas que caracterizam a evolução no gênero, é necessário um amplo estudo citogenético nas populações e espécies desconhecidas cromossomicamente.

PAULL e col. (1976) consideraram a ampla variabilidade encontrada em *Anolis* ($2n=25$ a 48), *Sceloporus* ($2n=22$ a 46) e *Liolaemus* ($2n=30$ a 44), como incomuns para os iguana não-acrodontes e explicáveis por evidências morfológicas e outras que mostravam ter esses táxons longo tempo de separação do estoque basal. À medida que mais estudos citogenéticos são realizados, menos apoio recebem essas hipóteses iniciais. É sempre bom lembrar que a literatura sobre estudos citogenéticos em lagartos não é suficientemente ampla diante do pouco se conhece da herpetofauna.

Os lagartos do gênero *Enyalius*, com exceção de *E. leechii*, são caracterizados por um grande polimorfismo no padrão de cores, dicromatismo sexual, variação ontogenética nas cores e mudanças na coloração que dificultam a sistemática do gênero. Todos esses aspectos obscurecem a interpretação das relações de parentesco. Um investimento grande deve ocorrer para que se aumente o número de localidades amostradas e de exemplares em estudos morfológicos, moleculares e citogenéticos. As informações sobre o gênero *Enyalius* obtidas através deste estudo citogenético e molecular são apenas uma fração do que é necessário averiguar sobre a diversidade, filogeografia, distribuição e ecologia, de modo a compreender melhor a história evolutiva destes elegantes lagartos endêmicos da nossa fauna.

VII. CONCLUSÕES

De acordo com as informações morfológicas, cromossômicas e moleculares obtidas até o momento, pode-se concluir que:

- ✓ O gênero *Enyalius* é muito mais diverso do que anteriormente se admitia. Ele reúne, pelo menos, 11 espécies: *E. sp 1* (*E. bibroni* da Serra da Jibóia: bibr BA1), *E. sp 2* (*E. catenatus* de Alagoas: cate AL1 e cate AL2), *E. sp 3* (*E. sp n* de Mucugê: sp BA1), *E. bilineatus*, *E. catenatus*, *E. bibroni*, *E. pictus*, *E. leechii*, *E. brasiliensis*, *E. iheringii* e *E. perditus*. Se considerarmos que os exemplares de *E. bilineatus* na verdade representam duas espécies distintas, teríamos 12 espécies no gênero;
- ✓ As análises filogenéticas com base em sequências de DNA mitocondrial e nuclear revelam que as espécies do gênero *Enyalius* estão distribuídas em dois clados principais: **clado 1** formado pelas espécies *E. brasiliensis*, *E. iheringii* e *E. perditus*, e o **clado 2** composto por *E. bibroni*, *E. bilineatus*, *E. catenatus*, *E. leechii*, *E. pictus* e três novas espécies;
- ✓ O Rio Doce marca geograficamente a separação entre os clados 1 e 2. Os rios Jequitinhonha e São Francisco também marcam a ocorrência das espécies *E. pictus* e *E. catenatus*, respectivamente;
- ✓ O gênero *Enyalius* não é conservado cromossomicamente; existe uma ampla variação do número diplóide de $2n=36$ a $2n=46$. O cariótipo de $2n=46$, presente na espécie recém descrita na literatura (*E. erythroceus*), com todos os macrocromossomos acrocêntricos, é muito distinto dos cariótipos das demais espécies do gênero;
- ✓ Rearranjos cromossômicos independentes originaram os cariótipos $2n=38$ (*E. catenatus* de Ilhéus, Bahia) e $2n=46$ (espécie nova de Mucugê, Bahia - *E. erythroceus*);

- ✓ É necessário um amplo investimento para aumentar o número de localidades e exemplares estudados para um melhor entendimento da evolução cromossômica, das relações de parentesco e da história evolutiva do gênero.

VIII. REFERÊNCIAS

- ANDERSON, S., BANKIER, A., BARRELL, B.G., BRUIJN, M.H.L., COULSON, A.R., DORUIN, J., EPERON, I.C., NIERLICH, D.P., ROE, B.A., SANGER, F., SCHREIER, P.H., SMITH, A.J.H., STADEN, R. and YOUNG, I.G. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457-465.
- ANDERSON, S., BRUIJN, M.H.L., COULSON, A.R., EPERON, I.C., SANGER, F., YOUNG, I.G. 1982. Complete sequence of mitochondrial DNA. Conserved features of the mammalian mitochondrial genome. *J. Mol. Biol.* 156: 683-717.
- ARÉVALO, E. DAVIS, S.K. and SITES, J.W. 1994. Mitochondrial DNA sequence divergence and phylogenetic relationships among eight chromosome races of the *Sceloporus grammicus* complex (Phrynosomatidae) in Central Mexico.- *Syst. Biol.* 43: 387-418.
- AUSTIN, J.J and ARNOLD, E.N. 2006. Using ancient and recent DNA to explore relationships of extinct and endangered *Leiopisma* skinks (Reptilia: Scincidae) in the Mascarene islands. *Mol. Phylogenet. Evol.* 29: 582-598.
- AVISE, J.C. 1994. *Molecular markers, Natural History and Evolution.* (eds. Chapman & Hall), New York, 511p.
- BAKER, R.J., BULL, J.J. and MENGDEN, G.A. 1971. Chromosomes of *Elaphe subocularis* (Reptilia: Serpentes), with the description of an in vivo technique for preparation of snake chromosomes.- *Experientia* 27: 1228-1229.
- BAKER, R.H., DESALLE, R. 1997. Multiple sources of character information and the phylogeny of Hawaiian drosophilids. *Systematic Biology* 46(4): 654-673.
- BEÇAK, M.L., BEÇAK, W. and DENARO, L. 1972. Chromosome polymorphism, geographical variation and karyotypes in Sauria.- *Caryologia* 25: 313-326.
- BERMINGHAM, E. and AVISE, J.C. 1986. Molecular zoogeography of fresh water fisher in the southeastern United States.- *Genetics* 113: 939-965.
- BERTOLOTTO, C.E.V., RODRIGUES, M.T., SKUK, G. and YONENAGA-YASSUDA, Y. 1996. Comparative cytogenetic analysis with differential staining in three species of *Liolaemus* (Squamata, Tropiduridae).- *Hereditas* 125: 257-264.
- BERTOLOTTO, C.E.V., RODRIGUES, M.T. and YONENAGA-YASSUDA, Y. 2001. Banding patterns, multiple sex chromosome system and localization of telomeric (TTAGGG)_n sequences by FISH on two species of *Polychrus* (Squamata, Polychrotidae).- *Caryologia* 54: 217-226
- BERTOLOTTO, C.E.V., PELLEGRINO, K.C.M, RODRIGUES, M.T. and YONENAGA-YASSUDA, Y. 2002 Comparative cytogenetics and supernumerary chromosomes in the Brazilian lizard genus *Enyalius* (Squamata, Polychrotidae).- *Hereditas* 136: 51-57.
- BERTOLOTTO, C.E.V., PELLEGRINO, K.C.M, RODRIGUES, M.T. e YONENAGA-YASSUDA, Y. 2003. Cariótipo distinto para uma espécie de lagartos do gênero *Enyalius* (Polychrotidae, Squamata).- *Genetics Mol. Biology. CD-ROM. 49º Congresso Nacional de Genética, Águas de Lindóia, SP.*

- BERTOLOTTO, C.E.V., PELLEGRINO, K.C.M, and YONENAGA-YASSUDA, Y. 2004. Occurrence of B chromosomes in lizards: a review.- *Cytogenet Genome Res.* 106: 243-246.
- BIBB, J.M., VAN TTEN, R.A., WRIGH, C.T., WALBERG, M.W., CLAYTON, D.A. 1981. Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA.- *Cell* 26: 167-180.
- BICKHAM, J.W. 1984. Patterns and modes of chromosomal evolution in reptiles.- In: *Chromosomes in evolution of eukaryotic groups* (eds A. SHARMA & A. SHARMA), CRC Press, Florida, p. 13-40.
- BICKHAM, J.W. and BAKER, R.J. 1979. Canalization model of chromosomal evolution.- *Bull. Car. Mus. Nat. Hist.* 13: 70-84.
- BIGARELLI, J.J. 1971. Variações climáticas no Quaternário Superior do Brasil e sua datação radiométrica pelo método do carbono 14. Paleoclimas Univ. S. Paulo 1: 1-22.
- BOGART, J.P. 1973. Method for obtaining chromosomes.- *Caldasia* XI: 29-40.
- BOSCH, H.A.J., ODIERNA, G., APREA, G., BARUCCA, M., CANAPA, A. CAPRIGLIONE, T. and OLMO, E. 2003. Karyological and genetic variation in middle eastern lacertid lizards, *Lacerta laevis* and the *Lacerta kulzeri* complex: a case of chromosomal allopatric speciation.- *Chromosome Research* 11: 165-178.
- BOULENGER, G.A. 1885. Catalogue of the lizards in the British Museum (natural History), London, vol.2, ed.2, 497p.
- BREMER, K. 1994. Branch support and tree stability.- *Cladistics* 10: 295-304.
- BRIDGE, D., CUNNINGHAM, B., SCHIERWATER, B., DeSALLE, R., BUSS, L.W. 1992. Class-level relationships in the phylum Cnidaria: Evidence from mitochondrial genome structure.- *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 8750-8753.
- BROWN, W.M., GEORGE, M., WILSON, A.C. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA.- *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 1967-1971.
- BROWN, W.M., PRAGER, E.M., WANG, A. and WILSON, A.C. 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution.- *J. Mol. Evol.* 18: 225-239.
- BULL, J.J. 1980. Sex determination in reptiles.- *The Quarterly Review of Biology* 55: 3-21.
- BURK, A., DOUZERY, J.P. and SPRINGER, M.S. 2002. The secondary structure of mammalian mitochondrial 16S rRNA molecules: refinements based on a comparative phylogenetic approach.- *J. Mammalian Evolution* 9 (3): 225-252.
- CAMIN, J.H. and SOKAL, R.R. 1965. A method for deducing branching sequences in phylogeny.- *Evolution* 19: 311-326.
- CAPULA, M., LAPINI, L. and CAPANNA, E. 1989. The karyotype of *Lacerta horváthi* (Reptilia, Sauria, Lacertidae).- *Genetica* 79: 11-16.
- CARDONE, A., CAPRIGLIONE, T., ODIERNA, G., REDI, C.A. and GARAGNA, S. 1990. Genomic intraspecific variations in some populations of *Podarcis s. sicula*.- In: *Cytogenetics of Amphibians and Reptiles* (ed E. OMO), Birkhäuser Verlag, Berlin, p. 247-254.
- 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.

- CARRANZA, S. and ARNOLD, E.N. 2002 Systematics, biogeography, and evolution of Hemidactylus geckos (Reptilia: Gekkonidae) elucidated using mitochondrial DNA sequences.- *Molecular Phylogenetics and Evolution*
- CARRANZA, S., ARNOLD, E.N. MATEO, J.A. GENIEZ, P. 2002. Relationships and evolution of the North African geckos, *Geckonia* and *Tarentola* (Reptilia: Gekkonidae), based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 23: 244-256.
- CASTRO, A.J., PERFECTTI, F., PARDO, M.C., CABRERO, J., LÓPEZ-LÉON, M.D. and CAMACHO, J.P.M. 1998. No harmful effects of a selfish B chromosome on several morphological and physiological traits in *Locusta migratoria* (Orthoptera, Acrididae).- *Heredity* 80: 753-759.
- CEI, J.M. 1993. Reptiles del noroeste, nordeste y este de la Argentina.- *Museo Regionale di Scienze Naturali, Torino*: 949pp.
- CHEN, Q., JAHIER, J. and CAUDERON, Y. 1993. The B chromosome system of Inner mongolin *Agropyron* Gaertn. 3. Cytogenetical evidence for B-A pairing at metaphase I.- *Hereditas* 119: 53-58.
- CHEN, W.J., BONILLO, C., LECOINTRE, G. 2003. Repeatability of clades as a criterion of reliability: a case study for molecular phylogeny of Acanthomorpha (Teleostei) with larger number of taxa.- *Mol. Phylogenet. Evol.* 26 (2): 262-288.
- CHEVALIER, M., DUFAURE, J.P. and LECHER, P. 1979. Cytogenetic study of several species of *Lacerta* (Lacertidae, Reptilia) with particular reference to sex chromosomes.- *Genetica* 50: 11-18
- CLAYTON, D.A. 1992. Transcription and replication of animal mitochondrial DNAs.- *Int. Rev. Cytol.* 141: 217-232.
- CLEMENT, D., POSADA, D. and CRANDALL, K.A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies.- *Molecular Ecology* 9: 167-1659.
- COLE, C.J. 1971. Karyotypes and relationships of the *Pyrocephalus* group of lizards in the genus *Sceloporus*.- *Herpetologica* 27: 1-8.
- COLE, C.J. 1978. Karyotypes and systematics of the lizards in the *variabilis*, *jalapae*, and *scalaris* species groups of the genus *Sceloporus*.- *Am. Mus. Novitates* 2653: 1-13.
- COLE, C.J. and LEAVENS, C.R. 1971. Chromosome preparations of amphibians and reptiles: improve technique.- *Herpetol. Rev.* 3: 102.
- COLE, C.J., LOWE, C.H. and WRIGHT, J.W. 1969. Sex chromosomes in teiid whiptail lizards (genus *Cnemidophorus*).- *Am. Mus. Novitates* 2395: 1-14.
- CÓLUS, M.S. and FERRARI, I. 1988. Mitotic and meiotic chromosomes of *Mabuya* (Scincidae:Reptilia).- *Genetica* 77: 105-111.
- COOPER, A. and PENNY, D. 1997. Mass survival of birds across the cretaceous tertiary boundary: molecular evidence.- *Science* 275: 1109-1113.
- COSTA, L.P. 2003. The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. *Journal of Biogeography* 30:71-86.
- CRACRAFT, J. and PRUM, R. 1988. Patterns and processes of diversification: speciation and historical congruence in some neotropical birds.- *Evolution* 42(3): 603-620.

- DAWLEY, R.M. and BOGART, J.P. 1989. *Evolution and ecology of unisexual vertebrates*. Albany, New York, 302p.
- DERJUSHEVA, S.E., LOGINOVA, J.A., PARADA, R., CHIRYAEVA, O.G., SMIRNOV, A.F. and JASZCZAK, K. 1998. The comparative analysis of NOR polymorphism detected by FISH and Ag-staining on horse chromosomes.- *Caryologia* 51: 1-11.
- DESJARDINS, P. and MORAIS, R. 1990. Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome-a novel gene order in higher vertebrates.- *J. Mol. Biol.* 212: 599-634.
- DESJARDINS, P. and MORAIS, R. 1991. Nucleotide sequence and evolution of coding and noncoding regions of a quail mitochondrial genome.- *J. Mol. Evol.* 32: 153-161.
- DOBIGNY, G., DUCROZ, J.F.; ROBINSON, T.J. and VOLOBOUEV, V. 2004. Cytogenetics and Cladistics.- *Syst. Biol.* 53 (3): 470-487.
- DUTRILLAUX, B. and COUTURIER, J. 1981. *La pratique de L'analyse chromosomique*, Paris: 86pp.
- EICHER, E. 1966. An improved air-drying technique for recovery of all stages of meiosis in the mammalian testis.- *Mamml. chrom. Newsl.* 20: 74.
- ESPOSTI, M., DE VRIES, S., CRIMI, M., GHELLI, A. PATARNELLO, T., MEYER, A. 1993. Mitochondrial cytochrome b: Evolution and structure of the protein.- *Biochim. Biophys. Acta.* 1143: 243-271.
- ESTES, R., QUEIROZ, K. and GAUTHIER, J. 1988. Phylogenetic relationships within Squamata.- In: *Phylogenetic relationships of the lizard families* (eds E. ESTES & G. PREGILL), Stanford, California, p.119-281.
- ETHERIDGE, R. 1959. The relationships of the anoles (Reptilia: Sauria; Iguanidae): an interpretation based on skeletal morphology Ph. D. diss., Univ. Michigan, Ann Arbor.
- ETHERIDGE, R. 1969. A review of the iguanid lizard genus *Enyalius*.- *Bull. Br. Mus.nat. Hist.(Zool.)* 18 (8): 233-260.
- ETHERIDGE, R. and QUEIROZ, K. 1988. A Phylogeny of Iguanidae.- In: *Phylogenetic relationships of the lizard families* (eds E. ESTES & G. PREGILL), Stanford, California, p. 283-367
- ETHERIDGE, R. and WILLIAMS, E. 1991. A review of the South American lizard genera *Urostrophus* e *Anisolepis* (Squamata: Iguania: Polychridae).- *Bull. Mus. Comp. Zool.* 152 (5): 317-361.
- FAGUNDES, V. 1993. *Análises cromossômicas e dos complexos sinaptonêmicos em roedores brasileiros das famílias Cricetidae e Echimyidae*. São Paulo, 194p. Dissertação (Mestrado)- Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- FARRIS, J.S. 1989. The retention index and rescaled consistency index.- *Cladistics* 5: 417-419.
- FELSENSTEIN, J. 1978. Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading.- *Syst. Zool.* 27: 401-410.
- FELSENSTEIN J. 1981a. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach.- *J. Mol. Evol.* 17: 368-376.
- FELSENSTEIN J. 1981b. A likelihood approach to character weighting and what it tell us about parsimony and compatibility. *Biol. J. Linn. Soc.* 16: 183-196.

- FELSENSTEIN J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.
- FELSENSTEIN J. 1993. PHYLIP, version 3.5c. Department of genetics, University of Washington, Seattle.
- FLAVELL, R.B. and RIMPAU, J. 1975. Ribosomal RNA genes and supernumerary B chromosomes of rye.- *Heredity* **35**: 127-131.
- FLORES-VILLELA, O., KJER, K.M., BENABIB, M. and SITES, J.W. 2000. Multiple data sets, congruence, and hypothesis testing for the phylogeny of basal groups of the lizard genus *Sceloporus* (Squamata, Phrynosomatidae).- *Syst. Biol.* **49**(4): 713-739.
- FORD, C.F. and HAMERTON, J.L. 1956. A colchicine hypotonic citrate squash sequence for mammalian chromosomes.- *Stain Tech.* **31**: 247-251.
- FORESTI, F., ALMEIDA-TOLEDO, L.F. and TOLEDO, S.A. 1981. Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes.- *Cytogenet. Cell Genet.* **31**: 137-144.
- FORESTI, F.P., OLIVEIRA, C e FORESTI, F. 1995. Estudo da densidade populacional e ocorrência de cromossomos B em *Astyanax scabripinnis paranae* do córrego da Cascatinha (Botucatu, SP).- *Rev. Brasil. Genet.* **18** (suppl): 453.
- FRIESEN, V.L. and ANDERSON, D.J. 1997. Phylogeny and evolution of the Sulidae (Aves: Pelecaniformes): a test of alternative modes of speciation.- *Mol. Phylogenet. Evol.* **7**: 252-260
- FROST, D.R. 1992. Phylogenetic analysis and taxonomy of the *Tropidurus* group of lizards (Iguania: Tropiduridae). -*Am. Mus. Novitates* **3033**: 68p.
- FROST, D. and ETHERIDGE, R. 1989. A phylogenetic analysis and taxonomy of iguanians lizards (Reptilia: Squamata).- *Misc. Publ. Univ. Kansas Mus. Nat. Hist.* **81**: 65p.
- FROST, D.R., ETHERIDGE, R., JANIES, D. and TITUS, T..A. 2001a. Total evidence, sequence alignment, evolution of polychrotid lizards, and a reclassification of the Iguania (Squamata: Iguania).- *Am. Mus. Novitates* **3343**:1-38.
- FROST, D.R., RODRIGUES, M.T., GRANT, T. and TITUS, T.A. 2001b. Phylogenetics of the lizard genus *Tropidurus* (Squamata: Tropiduridae: Tropidurinae): Direct optimization, descriptive efficiency, and sensitivity analysis of congruence between molecular data and morphology.- *Molecular Phylogenetics and Evolution* **21** (3): 352-371.
- FROST, S. 1969. The meiotic behaviour of accessory chromosomes in *Ranunculus acris*.- *Hereditas* **62**: 421-425.
- FU, J. 2000. Toward the phylogeny of the family Lacertidae- why 4708 base pairs of mtDNA sequences cannot draw the picture. *Biol. J. Linn. Soc.* **71**, 203-217.
- FU, J. 1999. Limited variation in *Lacerta mixta* and its parthenogenetic daughter species: Evidence from cytochrome b and ATPase 6 genes.- *Genetica* **105**: 227-231.
- GILHAM, N.W. 1994. *Organelle genes and genomes*. Oxford University Press, New York, USA, 424p.
- GIRIBET, G. and WHEELER, W.C. 1999. On gaps.- *Molecular Phylogenetics and Evolution* **13** (1): 132-143.

- GLADSTEIN, D.S. and WHEELER, W.C. 1997. POY: The optimization of alignment characteres. American Museum of Natural History, New York. Program and documentation available at <ftp://ftp.amnh.org/pub/molecular/poy/>.
- GOLD, J.R. and AMEMIYA, C.T. 1986. Cytogenetic studies in North American minnows (Cyprinidae). XII. Patterns of chromosomal nucleolus organizer region variation among 14 species.- *Can. J. Zool.* 64: 1869-1877.
- GOODPASTURE, C. and BLOOM, S.E. 1975. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining.- *Chromosoma* 53: 37-50.
- GORMAN, G.C. 1973. The chromosomes of the Reptilia, a citotaxonomic interpretation.- In: *Cytotaxonomy and Vertebrate Evolution* (eds A. B. CHIARELLI & E. CAPPANA), Acad. Press, New York, p. 349-424.
- GORMAN, G.C. and ATKINS, L. 1966. Chromosomal heteromorphism in some male lizards of the genus *Anolis*.- *Am. Naturalist* 100: 579-583.
- GORMAN, G.C. and ATKINS, L. 1967. The relationships of the *Anolis* of the *Roquet* species group (Sauria: Iguanidae). II. Comparative chromosome cytology.- *Syst. Zool.* 16: 137-143.
- GORMAN, G.C. and ATKINS, L. 1968. Confirmation of an X-Y sex determining mechanism in lizards (*Anolis*).- *Copeia* 1968: 159-160.
- GORMAN, G.C. and ATKINS, L. 1969. The zoogeography of lesser antillean *Anolis* lizards- an analysis based upon chromosomes and lactic dehydrogenases.- *Bull. Mus. Comp. Zool.* 138: 53-80.
- GORMAN, G.C. and STAMM, B. 1975. The *Anolis* lizards of Nona, Redonda, and La Blanquilla: chromosomes, relationships, and natural history notes.- *J. Herpet.* 9: 197-205.
- GORMAN, G.C., ATKINS, L. and HOLZINGER, T. 1967. New karyotypic data on 15 genera of lizards in the family Iguanidae, with discussion of taxonomic and cytological implications.- *Cytogenetics* 6: 286-299.
- GORMAN, G.C., THOMAS, R. and ATKINS, L. 1968. Intra- and interspecific chromosome variation in the lizard *Anolis cristatellus* and its closest relatives.- *Breviora* 293: 1-13.
- GRAY, M.W. and DOOLITTLE, R.F. 1982. Has the endosymbiont hypothesis been proven?.- *Microbiol. Evol. Rev.* 46: 1-42.
- GREEN, D.M. 1991. Supernumerary chromosomes in Amphibians.- In: *Amphibian cytogenetics and evolution* (eds D. M. GREEN and S. K. SESSIONS), Acad. Press, California, p. 333-357
- HALL, W.P. and SELANDER, R.K. 1973. Hybridization of karyotypically differentiated populations in the *Sceloporus grammicus* complex (Iguanidae).- *Evolution* 27: 226-242.
- HARRIS, D.J. 2003. Codon bias variation in c-mos between squamate families might distort phylogenetic inferences.- *Mol. Phylogenet. Evol.* 27: 540-544.
- HARRIS, D.J.; MARSHALL, J.C. and CRANDALL, K.A. 2001. Squamate relationships based on c-mos nuclear DNA sequences: increased taxon sampling improves bootstrap support.- *Amphib. Reptil.* 22: 235-242.
- HAYMAN, D.L. 1990. Marsupial Cytogenetics.- *Aust. J. Zool.* 37: 331-349.

- HAYASHI, J.I., TAGASHIRA, Y., YOSHIDA, M.C. 1985. Absence of extensive recombination between inter and intraspecies mitochondrial DNA in mammalian cells.- *Exp. Cell. Res.* 160: 387-395.
- HEDGES, S.B., PARKER, P.H., SIBLEY, C.G., KUMAR, S. 1996. Continental breakup and the ordinal diversification of birds and mammals.- *Nature* 381: 226-229.
- HEIDRICH, P., KONIG, C. and WINK, M. 1995. Molecular phylogeny of South American screech owls of the *Otus atricapillus* complex (Aves, Strigidae) inferred from nucleotide sequences of the mitochondrial cytochrome b gene.- *Z. Naturforsch* 50: 294-202.
- HENDERSON, A.S., WARBURTON, D., ATWOOD, K.C. 1972. Location of ribosomal DNA in the human chromosome complement.- *Proc. Nat. Acad. Sci.* 69: 3394-3398.
- HENRIQUES-GIL, N., ARANA, P. and SANTOS, J.L. 1983. Spontaneous translocations between B chromosomes and the normal complement in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*.- *Chromosoma* 88: 145-148.
- HERNANDEZ-VERDUN, D., HUBERT, J., BOURGEOIS, C.A. and BOUTEILLE, M. 1980. Ultrastructural localization of Ag-NOR stained proteins in the nucleolus during the cell cycle and in other nucleolar structures.- *Chromosoma* 79: 349-362.
- HERRERA, J.A., LÓPEZ-LEÓN, M. D., CABRERO, J., SHAW, M.W. and CAMACHO, J.P.M. 1996. Evidence for B chromosome drive suppression in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*.- *Heredity* 76: 633-639.
- HERRERO, P., TORRE, J., LÓPEZ-FERNANDEZ, C., GOSALVEZ, J. and SUMNER, A.T. 1993. Heterochromatin heterogeneity in *Triturus marmoratus* (Urodela: Salamandridae) demonstrated with specific DNA-binding fluorochromes and “in situ” restriction endonuclease/nick translation.- *Caryologia* 46: 343-353.
- HILLIS, D.M. and BULL, J.J. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis.- *Syst. Biol.* 42: 182-192.
- HILLIS, D.M., MORITZ, C. And MABLE, B.K. 1996. *Molecular Systematics*. 2nd ed. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts U.S.A.
- HILLIS, D.M. 1987. Molecular versus morphological approaches to systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 18: 23-42.
- HODGES, W.L. and ZAMUDIO, K.R. 2004. Horned lizard (Phrynosoma) phylogeny inferred from mitochondrial genes and morphological characters: understanding conflicts using multiple approaches.- *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31: 961-971.
- HOFGÄRTNER, F.J., SCHMID, M., KRONE, W., ZENZES, M.T. and ENGEL, W. 1979. Pattern of activity of nucleolus organizers during spermatogenesis in mammals as analyzed by silver-staining.- *Chromosoma* 71: 197-216.
- HOWELL, W.M. 1977. Visualization of ribosomal gene activity: silver stains proteins associated with rRNA transcribed from oocyte chromosomes.- *Chromosoma* 62: 361-367.
- HOWELL, W.M. and BLACK, D.A. 1980 Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method.- *Experientia* 36: 1014-1015.
- HSU, T.C., SPIRITO, S.E. and PARDUE, M.L. 1975. Distribution of 18+28S ribosomal genes in mammalian genomes.- *Chromosoma* 53: 25-36.

- HUELSENBECK, J.P., BULL, J.J. and CUNNINGHAM, C.W. 1996. Combining data in phylogenetic analysis.- *Trends Ecol. Evol.* 11: 152-158.
- IRWIN, D.M., KOCHER, T.D., WILSON, A.C. 1991. Evolution of cytochrome.
- JACKSON, J.F. 1978. Differentiation in the genera *Enyalius* and *Strobilurus* (Iguanidae): implications for Pleistocene climatic changes in eastern Brazil.- *Arq. Zool., São Paulo* 30 (1): 1-79.
- JESUS, J., HARRIS, D.J. and BREHM, A. 2005. Phylogeography of *Mabuya maculilabris* (Reptilia) from São Tomé Island (Gulf of Guinea) inferred from mtDNA sequences.- *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37: 503-510.
- JIN, L. & NEI, M. 1990. Limitations of the evolutionary parsimony method of phylogenetic analysis.- *Mol. Biol. Evol.* 7: 82-102.
- JOHN, B. 1981. Chromosome change and evolutionary change: a critique.- In: *Evolution and Speciation* (eds W. R. ATCHLEY & D. S. WOODRUFF), Univ. Press, Cambridge, p. 23-51.
- JOHN, P.C.L. and JONES, R.N. 1970. Molecular heterogeneity of soluble proteins and histones in relationship to the presence of B chromosomes in rye.- *Exp. Cell Res.* 63: 271-276.
- JORDAN, G. 1987. At the heart of the nucleolus.- *Nature* 329: 489-490.
- JUKES, T.H. & CANTOR, C.R. 1969. Evolution of protein molecules. In Munro, H.N. (ed) *Mammalian protein metabolism*. Vol 3. Academic Press, New York, pp.21-132.
- KASAHARA, S., YONENAGA-YASSUDA, Y. and RODRIGUES, M.T. 1987a. Karyotype and evolution of the *Tropidurus nanuzae* species group (Sauria, Iguanidae).- *Rev. Brasil. Genet.* 10: 185-197.
- KASAHARA, S., YONENAGA-YASSUDA, Y. and RODRIGUES, M.T. 1987b. Geographical karyotypic variations and chromosome banding patterns in *Tropidurus hispidus* (Sauria, Iguanidae) from Brazil.- *Caryologia* 40: 43-57.
- KASAHARA, S., YONENAGA-YASSUDA, Y. SCHINCARIOL, R.A. and L'ABBATE, M. 1983. Chromosome mechanisms of sex determination, G- and C band patterns and nucleolus organizer regions in *Tropidurus torquatus* (Sauria, Iguanidae).- *Genetica* 60: 151-156.
- KASAHARA, S., YONENAGA-YASSUDA, Y., SUCUPIRA, M.C.A. and RODRIGUES, M.T. 1988. Estudos cromossômicos em três espécies de lagartos do gênero *Mabuya* (Família Scincidae).- *Ciênc. Cult. (suppl.)* 40: 761.
- KASAHARA, S., PELLEGRINO, K.C.M., RODRIGUES, M.T. and YONENAGA-YASSUDA, Y. 1996. Comparative cytogenetic studies of eleven species of the *Tropidurus torquatus* group (Sauria, Tropiduridae), with banding patterns.- *Hereditas* 125: 37-46.
- KIMURA, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences.- *J. Mol. Evol.* 16: 111-120.
- KING, M. 1981. Chromosome change and speciation in lizards.- In: *Evolution and Speciation* (eds W. R. ATCHLEY & D. S. WOODRUFF), Cambridge University Press, London, p. 262-285
- KING, M. 1984. Karyotypic evolution in *Gehyra* (Gekkonidae: Reptilia). IV. Chromosome change and speciation.- *Genetica* 64: 101-114.

- KING, M. 1990. Chromosomal and immunogenetic data: a new perspective on the origin of Australia's reptiles.- In: *Cytogenetics of Amphibians and Reptiles* (ed E. OLMO), Birkhäuser Verlag, Berlin, p. 153-180.
- KING, M. 1993. Species evolution: the role of chromosome change.- *Cambridge University Press, Cambridge*, 336p.
- KING, M. 1994. Unbuckling the cladistic straight jacket: an exercise in elementary cytogenetics and a reply to Kluge (1994).- *Herpetologica* 50: 222-237.
- KING, M. and ROFE, R. 1976. Karyotypic variation in the australian gekko *Phyllodactylus marmoratus* (Gray) (Gekkonidae: Reptilia).- *Chromosoma* 54: 75-87.
- KING, M., MENGDEN, G.A. and KING, D. 1982. A pericentric-inversion polymorphism and a ZZ/ZW sex-chromosome system in *Varanus acanthurus* Boulenger analyzed by G-and C-banding and Ag staining.- *Genetica* 58: 39-45.
- KING, M., CONTRERAS, N. and HONEYCUTT, R.L. 1990. Variation within and between nucleolar organizer regions in australian hyloid frogs (Anura) shown by 18S+28S *in situ* hybridization.- *Genetica* 80: 17-29.
- KLUGE, A.G. and FARRIS, J.S. 1969. Quantitative phyletics and the evolution of anurans.- *Syst. Zool.* 18: 1-32.
- KLUGE, A. G. 1994. Principles of phylogenetic systematics and the informativeness of the karyotype in documenting gekkotan lizard relationships.- *Herpetologica* 50: 210-221.
- KOCHER, T.D., THOMAS, W.K., MEYER, A., EDWARDS, S.V., PAABO, S., VILLABLANCA, F.X., WILSON, A.C. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers.- *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6196-6200.
- KRAJEWSKI, C. and KING, D.G. 1996. Molecular divergence and phylogeny: rates and patterns of cytochrome b evolution in cranes.- *Mol. Biol. Evol.* 13: 21-30.
- KUMAR, S. and HEDGES, S.B. 1998. A molecular timescale for vertebrate evolution.- *Nature* 392: 917-920.
- LAMBOROT, M. 1991. Karyotypic variation among populations of *Liolaemus monticola* (Tropiduridae) separated by riverine barriers in the andean range.- *Copeia* 1991: 1044-1059.
- LAMBOROT, M. 1998. A new derived and highly polymorphic chromosomal race of *Liolaemus monticola* (Iguanidae) from the "Norte Chico" of Chile.- *Chromosome Research* 6: 247-254.
- LAMBOROT, M. and ALVAREZ-SARRET, E. 1989. Karyotypic characterization of some *Liolaemus* lizards in Chile (Iguanidae).- *Genome* 32: 393-403.
- LAMBOROT, M., ALVAREZ, E., CAMPOS, I. and ESPINOZA, A. 1981. Karyotypic characterization of three chilean subspecies of *Liolaemus monticola*.- *J. Hered.* 72: 328-334.
- LANSMAN, R.A., AVISE, J.C. and HUETTEL, M.D. 1983. Critical experimental test of the possibility of "paternal leakage" of mitochondrial DNA.- *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80: 1969-1971.
- LANYON, S.M. and HALL, J.G. 1994. Reexamination of barbet monophyly using mitochondrial-DNA sequence data.- *Auk* 111: 389-397.

- LAZELL, J.D. 1992. The family Iguanidae: Disagreement with Frost and Etheridge (1989).- *Herpetological Rev.* 23: 109-112.
- LEAL-MESQUITA, E.R., FAGUNDES, V., YONENAGA-YASSUDA, Y. and ROCHA, P.L.B. 1993. Comparative cytogenetic studies of two karyomorphs of *Trichomys apereoides* (Rodentia, Echimyidae).- *Rev. Brasil. Genet.* 16: 639-651.
- LEE, K., FEINSTEIN, J. e CRACRAFT, J. 1997. The phylogeny of ratite birds: resolving conflicts between molecular and morphological data sets. In: Mindell DP, ed. *Avian Molecular Evolution and Systematics*. San Diego: Academic Press, 173-211.
- LEE, M.S.Y. e CALDWELL, M.W. 2000. *Adriosaurus* and the affinities of mosasaurs, dolichosaurs, and snakes.- *J. Paleontol.* 74: 915-937.
- LI, W.H. 1997. *Molecular Evolution*. Sinauer Associates. Sunderland. U.S.A. 487p.
- LÓPEZ-LEÓN, M.D., NEVES, N., SCHWARZACHER, T., HESLOP-HARRISON, J.S., HEWITT, G.M. and CAMACHO, J.P.M. 1994. Possible origin of a B chromosome deduced from its DNA composition using double FISH technique.- *Chromosome Research* 2: 87-92.
- MACEY, J.R.; LARSON, A; ANANJEVA, N.B. e PAPENFUSS, T.J. 1997a. Evolutionary shifts in three major structural features of the mitochondrial genome among iguanian lizards.- *J. Mol. Evol.* 44: 660-674.
- MACEY, J.R., LARSON, A. ANANJEVA, N.B., FANG, Z., PAPENFUSS, T.J. 1997b. Two novel gene orders and the role of light-strand replication in rearrangement of the vertebrate mitochondrial genome.- *Mol. Biol. Evol.* 14: 91-104.
- MAISTRO, E.L., FORESTI, F. and OLIVEIRA, C. 1995. Marcação pela CMA₃ dos cromossomos de 3 espécies de peixes com cromossomos Bs.- *Rev. Brasil. Genet.* 18 (suppl): 454.
- MARTIN, A.P. and PALUMBI, R.S. 1993. Protein evolution in different cellular environments: cytochrome b in sharks and mammals.- *Mol. Biol. Evol.* 10: 873-891
- MARTÍN-ALGANZA, A., CABRERO, J., LÓPEZ-LEÓN, M.D., PERFECTTI, F. and CAMACHO, J.P.M. 1997. Supernumerary heterochromatin does not affect several morphological and physiological traits in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*.- *Hereditas* 126: 187-189.
- MARUTANI, M. and KAMEMOTO, H. 1983. Transmission and significance of B chromosomes in *Anthurium warocqueanum*.- *Amer. J. Bot.* 70: 40-46.
- MATTHEE, C.A. and ROBINSON, T.J. 1997. Molecular phylogeny of the springhare, *Pedetes capensis*, based on mitochondrial DNA sequences.- *Mol. Biol. Evol.* 14: 20-29.
- McQUADE, L.R., HILL, R.J. and FRANCIS, D. 1994. B-chromosome systems in the greater glider, *Petauroides volans* (Marsupialia: Pseudocheiridae). II. Investigation of B-chromosome DNA sequences isolated by micromanipulation and PCR.- *Cytogenet. Cell Genet.* 66: 155-161
- MEYNE, J., BAKER, R.J., HOBART, H.H., HSU, T.C., RYDER, O.A., WARD, O.G., WILEY, J.E., WURSTER-HILL, D.H., YATES, T.L. and MOYZIS, R.K. 1990. Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)_n telomeric sequence in vertebrate chromosomes.- *Chromosoma* 99: 3-10.

- MIKELSAAR, A.V., SCHMID, M., KRONE, W., SCHWARZACHER, H.G. and SCHNEDL, W. 1977. Frequency of Ag-stained nucleolus organizer regions in the acrocentric chromosomes of man.- *Hum. Genet.* 37: 73-77.
- MILLER, D.A., DEV, V.G., TANTRAVAHI, R. and MILLER, O.J. 1976. Suppression of human nucleolus organizer activity in mouse-human somatic hybrid cells.- *Exp. Cell Res.* 101: 235-243
- MINDELL, D.P. 1997. *Avian molecular evolution and systematics*. Academic Press, California, 382p.
- MIYAKI, C.Y., MATIOLI, S.R., BURKE, T. and WAJNTAL, A. 1998. Parrot evolution and paleogeographical events: mitochondrial DNA evidence.- *Mol. Biol. Evol.* 15: 544-551.
- MOLA, L.M. and PAPESCHI, A.G. 1993. Meiotic studies in *Largus rufipennis* (Castelnau) (Largidae, Heteroptera): frequency and behaviour of ring bivalents, univalents and B chromosomes.- *Heredity* 71: 33-40.
- MORITZ, C. 1984a. The origin and evolution of parthenogenesis in *Heteronotia binoei* (Gekkonidae). I. Chromosome banding studies.- *Chromosoma* 89: 151-162.
- MORITZ, C. 1984b. The evolution of a highly variable sex chromosomes in *Gehyra purpurascens* (Gekkonidae).- *Chromosoma* 90: 111-119.
- MORITZ, C. 1986. The population biology of *Gehyra* (Gekkonidae): chromosome change and speciation.- *Syst. Zool.* 35: 46-67.
- MULLIS, K.B., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G., ERLICH, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction.- *Symp. Quant. Biol.* 51: 263-273.
- MURPHY, W.J. and COLLIER, G.E. 1996. Phylogenetic relationship within the aplocheiloid fish. *Dinos rivulus* (Cyprinodontiformes-Rivulidae): implication for Caribbean and Central American biogeography.-*Mol. Biol. Evol.* 10: 927-943.
- NEI, M., KUMAR, S. & TAKAHASHI, K. 2000. The optimization principle in phylogenetic analysis tends to give incorrect topologies when the number of nucleotides or amino acids used is small.- *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 12390-12397.
- NÉO, M.D. e MOREIRA-FILHO, O. 1995. Diferenças morfológicas dos cromossomos B em *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae).- *Rev Brasil. Genet.* 18 (suppl): 452.
- NEVES, N., BARÃO, A., CASTILHO, A., SILVA, M., MORAIS, L., CARVALHO, V. and VIEGAS, W. 1992. Influence of DNA methylation on rye B-chromosome nondisjunction.- *Genome* 35: 650-652.
- NIXON, K.C. & CARPENTER, J.M. 1993. On outgroups.- *Cladistics* 9: 413-426.
- NUR, U. and BRETT, B.L.H. 1988. Genotypes affecting the condensation and transmission of heterochromatic B chromosomes in the mealybug *Pseudococcus affinis*.- *Chromosoma* 96: 205-212.
- OJALA, D., MONTROYA, J., ATTARDI, G. 1981. tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria.- *Nature* 290: 470-474.
- OLMO, E. 1986. Reptilia.- In: *Animal Cytogenetics* (ed. B. John) Berlin, Gebruder, Borntraeger, p. 1-100.

- OLMO, E. 1987. DNA variation, phylogenesis and speciation in reptiles.- *Boll. Zool.* 54: 49-54.
- OLMO, E., ODIERNA, G. and COBROR, O. 1986. C-banding variability and phylogeny of Lacertidae.- *Genetica* 71: 63-74.
- OLMO, E., ODIERNA, G., CAPRIGLIONE, T. and CARDONE, A. 1990. DNA and chromosome evolution in lacertid lizards.- In: *Cytogenetics of Amphibians and Reptiles* (ed E. OLMO), Birkhäuser Verlag, Berlin, p. 181-204.
- OTA, H., HIKIDA, T., MATSUI, M. and MORI, A. 1992. Karyotypes of two species of the genus *Cyrtodactylus* (Squamata: Gekkonidae) from Sarawak, Malaysia.- *Caryologia* 45: 43-49.
- PAABO, S., THOMAS, W.K., WHITFIELD, K.M., KUMAZAWA, Y., WILSON, A.C. 1991. Rearrangements of mitochondrial transfer RNA genes in marsupials.- *J. Mol. Evol.* 33: 426-430
- PARDUE, M.L. and HSU, T.C. 1975. Locations of 18s and 28s ribosomal genes on the chromosomes of the Indian muntjac.- *J. Cell Biol.* 64: 251-254.
- PAULL, D., WILLIAMS, E.E. and HALL, W.P. 1976. Lizard karyotypes from the Galapagos islands: chromosomes in phylogeny and evolution.- *Breviora* 441: 1-31.
- PAULS, E. and BERTOLLO, L.A.C. 1983. Evidence for a system of supernumerary chromosomes in *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1981 (Pisces, Prochilodontidae).- *Caryologia* 36: 307-314.
- PECCININI, D. 1970. Variação nos cromossomos do lagarto *Polychrus marmoratus* (Sauria, Iguanidae) de diferentes localidades.- *Rev. Brasil. Biol.* 30: 1-4.
- PECCININI-SEALE, D. 1981. New developments in vertebrate cytotaxonomy. IV. Cytogenetic studies in reptiles.- *Genetica* 56: 123-148.
- PECCININI-SEALE, D. and FROTA-PESSOA, O. 1974. Structural heterozygosity in parthenogenetic populations of *Cnemidophorus lemniscatus* (Sauria, Teiidae) from the Amazonas Valley.- *Chromosoma* 47: 439-451
- PECCININI, D., FROTA-PESSOA, O. and FERRARI, I. 1971. Sex determination of the “pseudo-X0/XX” type in the brazilian lizard *Polychrus* sp (Sauria, Iguanidae).- *Caryologia* 24: 129-139
- PELLEGRINO, K.C.M. 1993. *Caracterização cromossômica em 16 espécies das famílias Tropiduridae, Polychrotidae e Gekkonidae (Sauria) pela aplicação de técnicas de coloração diferencial*. São Paulo, 172p. Dissertação (Mestrado)- Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo
- PELLEGRINO, K.C.M. 1998. *Diversidade Cariotípica e evolução cromossômica em lagartos das famílias Gymnophthalmidae e Gekkonidae (Squamata): Evidências baseadas em coloração diferencial e hibridação in situ fluorescente (FISH)*. São Paulo, 137p. Tese (Doutorado)- Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo
- PELLEGRINO, K.C.M., YONENAGA-YASSUDA, Y. and RODRIGUES, M.T. and. 1994. Cytogenetic studies in six species of Tropiduridae (Sauria).- *Rev. Brasil. Genet.* 17: 401-408.
- PELLEGRINO, K.C.M., KASAHARA, S., RODRIGUES, M.T. and YONENAGA-YASSUDA, Y. 1997. Pericentric inversion events in karyotypic distinction of brazilian lizards of genus

- Phyllopezus* (Squamata, Gekkonidae) detected by chromosomal banding patterns.- *Hereditas* 127: 255-262.
- PELLEGRINO, K.C.M., SUCUPIRA, M.C.A., KASAHARA, S., RODRIGUES, M.T. and YONENAGA-YASSUDA, Y. 1995. C- and R-banding patterns and nucleolus organizer regions in the karyotype of *Hemidactylus mabouia* (Sauria, Gekkonidae).- *Rev. Brasil. Genet.* 18: 527-531.
- PELLEGRINO, K.C.M, RODRIGUES, M.T. and YONENAGA-YASSUDA, Y. 1999a. Chromosomal evolution in the Brazilian lizards of genus *Leposoma* (Squamata, Gymnophthalmidae) from Amazon and Atlantic rain forests: banding patterns and FISH of telomeric sequences.- *Hereditas* 131: 15-21.
- PELLEGRINO, K.C.M, RODRIGUES, M.T. and YONENAGA-YASSUDA, Y. 1999b. Chromosomal polymorphisms due to supernumerary chromosomes and pericentric inversions in the eyelid-less microteiid lizard *Nothobachia ablephara* (Squamata, Gymnophthalmidae).- *Chrom. Res.* 7: 247-254.
- PELLEGRINO, K.C.M, BERTOLOTTO, C.E.V., RODRIGUES, M.T. and YONENAGA-YASSUDA, Y. 1999c. Banding patterns, heteromorphic sex chromosomes and Ag-stained NORs after pachytene stage in the meiosis of the Brazilian lizard *Urostrophus vautieri* (Squamata, Polychrotidae).- *Caryologia* 52 (1-2): 21-26.
- PELLEGRINO, K.C.M, RODRIGUES, M.T., YONENAGA-YASSUDA, Y. and SITES, J.W. 2001. A molecular perspective on the evolution of microteiid lizards (Squamata, Gymnophthalmidae), and a new classification for the family.- *Biological J. of the Linnean Society* 74: 315-338.
- PELLEGRINO, K.C.M.; RODRIGUES, M.T. & YONENAGA-YASSUDA, Y. 2003. The triploid karyotype of *Leposoma percarinatum* (Squamata, Gymnophthalmidae).- *J. Herpetology* 37 (1): 197-199.
- PELLEGRINO, K.C.M.; RODRIGUES, M.T.; WAITE, A.N.; MORANDO, M.; YONENAGA-YASSUDA, Y. & SITES, J.W. 2005a. Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwinii* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the brazilian Atlantic Forest.- *Biological J. Linnean Society* 85: 13-26.
- PELLEGRINO, K.C.M.; RODRIGUES, M.T. & SITES, J.W. 2005b. Molecular phylogeny and origin of parthenogenesis in lizards of the genus *Leposoma* (Squamata, Gymnophthalmidae). *Fifth World Congress of Herpetology, Stellenbosch, áfrica do Sul* : p.142.
- PENDÁS, A.M., MORÁN, P. and GARCIA-VÁZQUEZ, E. 1993. Ribosomal RNA genes are interspersed throughout a heterochromatic chromosome arm in atlantic salmon.- *Cytogenet. Cell Genet.* 63: 128-130.
- PHILLIPS, A., JANIES, D. and WHEELER, W. 2000. Multiple sequence alignment in phylogenetic analysis.- *Molecular Phylogenetics and Evolution* 16 (3): 317-330.
- PINNA-SENN, E., TADA, I.E. and LISANTI, J.A. 1987. Polymorphism of the microchromosomes and the nucleolar organizer region in *Pristidactylus achalensis* (Sauria: Iguanidae).- *Herpetologica* 43: 120-127.
- PORTELA, A.L.B.S., GALETTI, P.M.Jr and BERTOLLO, L.A.C. 1988. Considerations on the chromosome evolution of Tetragonopterinae (Pisces, Characidae).- *Rev. Brasil. Genet.* 11: 307-316.

- PORTER, C.A. and SITES, J.W.Jr. 1986. Evolution of *Sceloporus grammicus* complex (Sauria: Iguanidae) in central Mexico: population cytogenetics.- *Syst. Zool.* 35: 334-358.
- PORTER, C.A., HAIDUK, M.W. and QUEIROZ, K. 1994. Evolution and phylogenetic significance of ribosomal gene location in chromosomes of squamate reptiles.- *Copeia* 1994: 302-313.
- PORTER, C.A., HAMILTON, M.J., SITES, J.W. and BAKER, R.J. 1991. Location of ribosomal DNA in chromosomes of squamate reptiles: systematic and evolutionary implications.- *Herpetologica* 47: 271-280.
- POSADA, D. e CRANDALL, K.A. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.
- POUGH, H.F.; ANDREWS, R.M.; CADLE J.E.; CRUMP, M.L.; SAVITZKY, A.M. & WELLS, K.D. 2004. Herpetology 3rd edition Prentice Hall, New Jersey.
- REED, K.M., GREENBAUM, I.F. and SITES, J.W.Jr. 1995. Dynamics of a novel chromosomal polymorphism within a hybrid zone between two chromosome races of the *Sceloporus grammicus* complex (Sauria, Phrynosomatidae).- *Evolution* 49: 48-60.
- REEDER, T.W. and MONTANUCCI R.R. 2001. Phylogenetic analysis of the horned lizards (Phrynosomatidae: *Phrynosoma*): Evidence from mitochondrial DNA and morphology.- *Copeia* 2: 309-323.
- RIBAS, C.C.; MIYAKI, C.Y. 2004. Molecular systematics in Aratinga parakeets: species limits and historical biogeography in the “solstitialis” group, and the systematic position of *Nandayus nenday*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30: 663-675.
- RITOSSA, F.M., ATWOOD, K.C. and SPIEGELMAN, S. 1966. A molecular explanation of the bobbed mutants of *Drosophila* as partial deficiencies of “ribosomal” DNA.- *Genetics* 54: 819-834.
- RODRIGUES, M.T., YONENAGA-YASSUDA, Y. and KASAHARA, S. 1989. Notes on the ecology and karyotypic description of *Strobilurus torquatus* (Sauria, Iguanidae).- *Rev. Brasil. Genet.* 12: 747-759.
- RODRIGUES, MT., FREITAS, M.A., SILVA, T.F.S. and BERTOLOTTO, C.E.V. 2006. A new species of lizard genus *Enyalius* (Squamata, Leiosauridae) from the highlands of Chapada Diamantina, state of Bahia, Brazil, with a key to species.- *Phyllomedusa* 5 (1): 11-24.
- RONQUIST, F. and HUELSENBECK, J.P. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models.- *Bioinformatics* 19 (12): 1572-1574.
- RUIZ, I.R.G. 1982. Organizadores nucleolares e evolução cariotípica em anfíbios poliplóides.- *Ciência Cult.* 34: 470-473.
- RUIZ, I.R.G., SOMA, M. and BEČAK, W. 1981. Nucleolar organizer regions and constitutive heterochromatin in polyploid species of the genus *Odontophrynus* (Amphibia, Anura).- *Cytogenet. Cell Genet.* 29: 84-98.
- RUSSO, C.A.M., TAKEZAKI, N. and NEI, M. 1996. Efficiencies of different genes and different tree-building methods in recovering a known vertebrate phylogeny. - *Mol. Biol. Evol.* 13: 525-536.

- SAGATA, N., OSKARSSON, M., COPELAND, T., BRUMBAUGH, J. and WOUDE, G.F.V. 1988. Function of *c-mos* proto-oncogene product in meiotic maturation in *Xenopus* oocytes.- *Nature* 335, 519-525.
- SAITOU, N. & NEI, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.- *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- SALVADOR, L.B. and MOREIRA-FILHO, O. 1992. B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae).- *Heredity* 69: 50-56.
- SÁNCHEZ, A., JIMÉNEZ, R., BURGOS, M., STITOU, S., ZURITA, F and GUARDIA, R.D. 1995. Cytogenetic peculiarities in the algerian hedgehog: silver stains not only NORs but also heterochromatic blocks.- *Heredity* 75: 10-16.
- SANTOS, N. and SOUZA, M.J. 1998. Characterization of the constitutive heterochromatin of *Carollia perspicillata* (Phyllostomidae, Chiroptera) using the base-specific fluorochromes, CMA₃ (GC) and DAPI (AT).- *Caryologia* 51: 51-60.
- SANTOS, R.M.L.; BERTOLOTTO, C.E.V.; PELLEGRINO, K.C.M.; RODRIGUES, M.T. & YONENAGA-YASSUDA, Y. 2003. Chromosomal studies on sphaerodactyl lizards of genera *Gonatodes* and *Coleodactylus* (Squamata, Gekkonidae) using differential staining and fragile sites analyses.- *Cytogenet. Genome Res* 103: 128-134.
- SCHMID, M; FEICHTINGER, W; NANDA, I; SCHAKOWSKI, R; GARCÍA, R.V.; PUPPO, J.M. & BADILLO, A.F. 1994. An extraordinarily low diploid chromosome number in the reptile *Gonatodes taniae* (Squamata, Gekkonidae).- *J. Heredity* 85: 255-260.
- SCHMID, M. 1982. Chromosome banding in amphibia. VII. Analysis of the structure and variability of NORs in Anura.- *Chromosoma* 87: 327-344.
- SCHMID, M. and GUTTENBACH, M. 1988. Evolutionary diversity of reverse (R) fluorescent chromosome bands in vertebrates.- *Chromosoma* 97: 101-114.
- SCHMID, M., LÖSER, C., SCHMIDTKE, J. and ENGEL, W. 1982. Evolutionary conservation of a common pattern of activity of nucleolus organizers during spermatogenesis in vertebrates.- *Chromosoma* 86: 149-179.
- SCHMID, M., STEINLEIN, C., NANDA, I and EPPLEN, J.T. 1990. Chromosome banding in amphibia.- In: *Cytogenetics of Amphibians and Reptiles* (ed E. OLMO), Birkhäuser Verlag, Berlin, p. 21-45.
- SCHMID, M. ZIEGLER, C.G., STEINLEIN, C. NANDA, I., HAAF, T. 2002. Chromosome banding in Amphibia. XXIV. The B chromosomes of *Gastrotheca espeletia* (Anura, Hylidae).- *Cytogenetic Genome Res.* 97: 205-218.
- SCHNEIDER, H. 2003. *Métodos de análise filogenética*. Holos Editora, Ribeirão Preto, 114p.
- SCHULTE, J.A, MACEY, J.R., LARSON, A. and PAPENFUSS, T.J. 1998. Molecular tests of phylogenetic taxonomies: a general procedure and example using four subfamilies of the lizard family Iguanidae.- *Molecular Phylogenetics and Evolution* 10: 367-376.
- SCHULTE, J.A., VALLADARES J..P. and LARSON, A. 2003. Phylogenetic relationships within Iguanidae inferred using molecular and morphological data and a phylogenetic taxonomy of iguanian lizards.- *Herpetologica* 59 (3): 399-419.
- SEUTIN, G., LANG, B.F., MINDELL, D.P.; MORAIS, R. 1994. Evolution of the Wancy region in amniote mitochondrial DNA.- *Mol. Biol. Evol.* 11: 329-340.

- SITES, J.W. 1983. Chromosome evolution in the iguanid lizard *Sceloporus grammicus*. I. Chromosome polymorphisms.- *Evolution* 37: 38-53.
- SITES, J.W. and MORITZ, C. 1987. Chromosomal evolution and speciation revisited.- *Syst. Zool.* 36: 153-174.
- SITES, J.W. and REED, K.M. 1994. Chromosomal evolution, speciation, and systematics: some relevant issues.- *Herpetologica* 50: 237-249.
- SITES, J.W., PECCININI-SEALE, D.M., MORITZ, C., WRIGHT, J.W. and BROWN, W.M. 1990. The evolutionary history of parthenogenetic *Cnemidophorus lemniscatus* (Sauria, Teiidae). I. Evidence for a hybrid origin.- *Evolution* 44: 906-921.
- SITES, J.W., DAVIS, S.K., HUTCHISON, D.W., MAURER, B.A. and LARA, G. 1993. Parapatric hybridization between chromosome races of the *Sceloporus grammicus* complex (Phrynosomatidae): structure of the Tulancingo transect.- *Copeia* 1993: 373-398.
- SITES, J.W., DAVIS, S.K., GUERRA, T., IVERSON, J.B. and SNELL, H.L. 1996. Character congruence and phylogenetic signal in molecular and morphological data sets: a case study in the living Iguanas (Squamata, Iguanidae).- *Mol. Biol. Evol.* 13 (8): 1087-1105.
- SNEATH, P.H.A. & SOKAL, R.R. 1973. Numerical taxonomy.- W.H. Freeman, San Francisco.
- SOLA, L., MONACO, P.J. and RASCH, E.M. 1990. Cytogenetics of bisexual/unisexual species of *Poecilia*. I. C-bands, Ag-NOR polymorphisms, and sex chromosomes in three populations of *Poecilia latipinna*.- *Cytogenet. Cell Genet.* 53: 148-154.
- SOLA, L., ROSSI, A.R., IASELLI, V., RASCH, E.M. and MONACO, P.J. 1992. Cytogenetics of bisexual/unisexual species of *Poecilia*. II. Analysis of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Poecilia mexicana mexicana* by C-banding and DAPI, quinacrine, chromomycin A₃, and silver staining.- *Cytogenet. Cell Genet.* 60: 229-235.
- SOLLEDER, E. and SCHMID, M. 1984. XX/XY-sex chromosomes in *Gekko gekko* (Sauria, Reptilia).- *Amphibia-Reptilia* 5: 339-345.
- SORENSEN, M.D. TreeRot, ver. 2. Boston: Boston University, 1999.
- SUMNER, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin.- *Exptl. Cell Res.* 75: 304-306.
- SUZUKI, Y., GLAZKO, G.V., NEI, M. 2002. Overcredibility of molecular phylogenies obtained by Bayesian phylogenetics.- *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99 (25): 16138-16143.
- SWORFFORD, D. L. 2003. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), ver.4. Sunderland: Sinauer Assoc.
- TAJIMA, F. & NEI, M. 1984. Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences.- *Mol. Biol. Evol.* 1: 269-285.
- TAKAHASHI, K. & NEI, M. 2000. Efficiencies of fast algorithms of phylogenetic inference under the criteria of maximum parsimony, minimum evolution, and maximum likelihood when a large number of sequences are used.- *Mol. Biol. Evol.* 17: 1251-1258.
- TAMURA, K. e NEI, M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitution in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees.- *Mol. Biol. Evol.* 10: 512-526.

- TAVARÉ, S. 1986. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. In: *Some mathematical questions in biology – DNA sequence analysis* (ed. Miura RM), pp. 57-86.- Amer. Math. Soc., Providence, RI.
- TEMPLETON, A.R.; CRANDALL, K.A. E SING, C.F. 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* 132:619-633.
- THOMPSON, P. and SITES, J.W. 1986. Two aberrant karyotypes in the sacebrush lizard (*Sceloporus graciosus*): triploidy and a “supernumerary” oddity.- *Great Basin Naturalist* 46: 224-227.
- TORRES-CARVAJAL, O., SCHULTE, J.A. and CADLE, J.E. 2005. Phylogenetic relationships of South American lizards of the genus *Stenocercus* (Squamata: Iguania): A new approach using a general mixture model for gene sequence data.- *Molecular Phylogenetics and Evolution*.
- TOWNSEND, T.M.; LARSON, A.; LOUIS, E. e MACEY, R. 2004. Molecular Phylogenetics of Squamata: the position of Snakes, Amphisbaenians, and Dibamids, and the root of the Squamata tree.- *Syst. Biol.* 53 (5): 735-757.
- VANZOLINI, P.E. 1972. Miscellaneous notes on the ecology of some Brazilian lizards (Sauria).- *Papéis Avulsos Zool. S. Paulo* 26 (8): 83-115.
- VANZOLINI, P.E. e WILLIAMS, 1970. South America anoles: The geographic differentiation and evolution of the *Anolis chrysolepis* species group (Sauria, Iguanidae).- *Arq. Zool., São Paulo* 19: 1-240.
- VERMA, R.S. 1988. *Heterochromatin: molecular and structural aspects*, Cambridge University Press, 301p.
- VOLOBOUEV, V. and INEICH, I. 1994. A chromosome banding study of *Ailuronyx seychellensis* (Reptilia, Gekkonidae) and its phylogenetic affinities.- *J. Herpetology* 28: 267-270.
- VOLOBOUEV, V., PASTEUR, G., INEICH, I. and DUTRILLAUX, B. 1993. Chromosomal evidence for a hybrid origin of diploid parthenogenetic females from the unisexual-bisexual *Lepidodactylus lugubris* complex (Reptilia, Gekkonidae).- *Cytogenet. Cell Genet.* 63: 194-199
- WEBSTER, T.P., HALL, W.P. and WILLIAMS, E.E. 1972. Fission in the evolution of a lizard karyotype.- *Science* 177: 611-613.
- WHEELER, W.C. 1996. Optimization alignment: the end of multiple sequence alignment in phylogenetics?.- *Cladistics* 12: 1-10.
- WHEELER, W.C. 2003. Implied alignment: a synapomorphy-based multiple-sequence alignment method and its use in cladogram search. *Cladistics* 19: 261-268.
- WHEELER, W.C., GLADSTEIN, D.S., De LAET, J. 2003. POY: Phylogeny reconstruction via Optimization of DNA and other data, version 3.0.11. *American Museum of Natural History*, New York: 67p.
- WHITE, M.J.D. 1978. Chain processes in chromosomal speciation.- *Syst. Zool.* 27: 285-298.

- WHITING, A.S., BAUER, A.M. and SITES, J.W. 2003. Phylogenetic relationships and limb loss in sub-Saharan African scincine lizards (Squamata: Scincidae).- *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: 582-598.
- WHITING, A.S.; SITES JR., J.W.; PELLEGRINO, K.C.M.; RODRIGUES, M.T. (2006). Comparing alignment methods for inferring the history of the new world lizard genus *Mabuya* (Squamata: Scincidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 38: 719-730.
- WIENS, J.J. 1998. Combining data sets with different phylogenetic histories. *Systematic Biology* 47(4): 568-581.
- WOLSTENHOLME, D.R. 1992. Animal mitochondrial DNA: Structure and evolution.- *Int. Rev. Cytol.* 141: 173-216.
- XIA, X e XIE, Z. 2001.DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution.- *Journal of heredity* 92: 371-373.
- ZAMUDIO, K. R. e GREENE, H.W. 1997. Phylogeography of the bushmaster (*Lachesis muta*: Viperidae): implications from neotropical biogeography, systematics, and conservation.- *Biol. J. Linnean Soc.* 62: 421-442.
- YONENAGA-YASSUDA, Y. 1972. *Polimorfismos cromossômicos em roedores brasileiros*. São Paulo, 214p. Tese (Doutorado)- Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- YONENAGA-YASSUDA, Y. and RODRIGUES, M.T. 1999. Supernumerary chromosome variation, heteromorphic sex chromosomes and banding patterns in microteiid lizard of the genus *Micrablepharus* (Squamata, Gymnophthalmidae).- *Chrom. Research* 6: 21-29.
- YONENAGA-YASSUDA, Y., MAIA, V. and L'ABBATE, M. 1988a. Two tandem fusions and supernumerary chromosomes in *Nectomys squamipes* (Cricetidae, Rodentia).- *Caryologia* 41: 25-39.
- YONENAGA-YASSUDA, Y., ASSIS, M.F.L. and KASAHARA, S. 1992. Variability of the nucleolus organizer regions and the presence of the rDNA genes in the supernumerary chromosome of *Akodon* aff. *arviculoides* (Cricetidae, Rodentia).- *Caryologia* 45: 163-174.
- YONENAGA-YASSUDA, Y., PEREIRA, L.A., ARMADA, J.L. and L'ABBATE, M. 1987. Chromosomal polymorphism in *Akodon reinhardti* Langguth, 1975 (Rodentia, Cricetidae).- *Rev. Brasil. Genet.* 10: 199-208.
- YONENAGA-YASSUDA, Y., KASAHARA, S. CHU, T.H. and RODRIGUES, M.T. 1988b. High-resolution RBG-banding pattern in the genus *Tropidurus* (Sauria, Iguanidae).- *Cytogenet. Cell Genet.* 48: 68-71.
- YONENAGA-YASSUDA, Y., VANZOLINI, P.E., RODRIGUES, M.T. and CARVALHO, C.M. 1995. Chromosome banding patterns in the unisexual microteiid *Gymnophthalmus underwoodi* and in two related sibling species (Gymnophthalmidae, Sauria).- *Cytogenet. Cell Genet.* 70: 29-34.
- YONENAGA-YASSUDA, Y., RODRIGUES, M.T. and PELLEGRINO, K.C.M. 2005. Chromosomal banding patterns in the eyelid-less microteiid radiation: The $X_1X_1X_2X_2:X_1X_2Y$ sex chromosome system in *Calyptommatus* and the karyotypes of *Psilophthalmus* and *Tretioscincus* (Squamata, Gymnophthalmidae).- *Cenetics and Molecular Biology* 28(4): 700-709.

- YONENAGA-YASSUDA, Y., MORI, L., CHU, T.H. and RODRIGUES, M.T. 1996. Chromosomal banding patterns in the eyelid-less microteiid radiation: *Procellosaurinus* and *Vanzosaura* (Squamata, Gymnophthalmidae).- *Cytogenet. Cell Genet.* 74: 203-210.
- YONENAGA-YASSUDA, Y., ASSIS, M.F.L., KASAHARA, S. L'ABBATE, M. and SOUZA, M.J. 1983. Nucleolar organizer regions in *Akodon arviculoides* (Cricetidae, Rodentia): evidence for the activity of rDNA genes in both X chromosomes of females.- *Cytogenet. Cell Genet.* 35: 143-147.