Marcia Maria Laguna

Estudos cromossômicos e moleculares em espécies
de lagartos microteídeos, com ênfase na tribo
Ecpleopodini (Gymnophthalmidae, Squamata)

Chromosomal and molecular studies on species of microteiid lizards, with
emphasis on Ecpleopodini (Gymnophthalmidae, Squamata).

São Paulo

2011

Marcia Maria Laguna

Estudos cromossômicos e moleculares em espécies
de lagartos microteídeos, com ênfase na tribo
Ecpleopodini (Gymnophthalmidae, Squamata).

Chromosomal and molecular studies on species of microteiid lizards, with
emphasis on Ecpleopodini (Gymnophthalmidae, Squamata).

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências da Universidade de
São Paulo, para a obtenção de Título
de Mestre em Ciências, na Área de
Biologia (Genética).

Orientadora: Profa. Dra. Yatiyo
Yonenaga-Yassuda

São Paulo

2011

Laguna, Marcia Maria

Estudos cromossômicos e moleculares em espécies de lagartos microteídeos, com ênfase na tribo Eubleopodini (Gymnophthalmidae, Squamata).

184 páginas

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

1. Gymnophthalmidae 2. Citogenética 3. Relações filogenéticas I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a). Yatiyo Yonenaga-Yassuda

Para aqueles que ajudaram a me aproximar do vaga-lume (ou “baga-lume”) no fim do túnel e cuja disposição e boa vontade, especialmente nos momentos críticos, me fizeram seguir em frente.

“De tudo ficaram três coisas:
A certeza de que estamos começando...
A certeza de que é preciso continuar...
A certeza de que podemos ser interrompidos
antes de terminar...
Façamos da interrupção um caminho novo...
Da queda, um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro!”

(Fernando Sabino)

Agradecimentos

Diversas pessoas e instituições participaram, direta ou indiretamente, da realização desta dissertação, contribuindo não somente para minha formação profissional, mas para minha formação pessoal, tornando o desenvolvimento desse trabalho mais divertido e proveitoso. A elas meus agradecimentos:

À professora Yatiyo, pela oportunidade de me deixar fazer parte da equipe de seu laboratório, com a realização de um estágio em 2005, seguido pela Iniciação Científica e Mestrado. Obrigada por aceitar me orientar, especialmente com um projeto de lagartos, por todo o conhecimento compartilhado, discussões valiosas, pela confiança que deposita em mim, pelo o apoio e incentivo na realização deste trabalho e por me ensinar a amar a citogenética.

Ao professor Miguel, por ter divulgado o estágio com lagartos durante uma aula da disciplina Vertebrados no segundo ano da graduação. Pelo entusiasmo em contar sua linha de pesquisa e, posteriormente, na elaboração dos projetos de Iniciação Científica e de Mestrado, pela confiança no meu trabalho, pelo incentivo constante, pelas discussões, coleta de animais, conversas e oportunidade de participar de viagens de campo. Por ser um exemplo de profissional extremamente competente e apaixonado pelo que faz.

Aos colegas e amigos que fazem ou já fizeram parte do Laboratório de Citogenética de Vertebrados e com os quais compartilhei boas risadas, momentos de descontração e ensinamentos: Camilla, Carol Elena, Glaciene, Karen, Kátia, Maria José, Priscila, Renata, Roberto, Rodrigo, Silvia, Taís. À Kátia, pelas sugestões e comentários ao longo do mestrado. À Camilla, pela amizade, pelas tantas conversas, artes no laboratório, risadas, pela ajuda em arrumar um emprego quando terminou a vigência da minha bolsa de Mestrado e por ser amiga. Ao Rodrigo pelo direcionamento com algumas análises moleculares e ajuda com o alinhamento do *c-mos* e ao Beto pela ajuda inicial com o TreeFinder e discussão de alguns dados moleculares. E em especial à Rê, companheira de campo e de acontecimentos engraçados (como o comandante “Joystick” e o “olé” do chocolate), pelo papel fundamental no desenvolvimento dessa dissertação. Obrigada pela amizade, por ouvir meus desabafos, por terminar de pingar as lâminas dos animais em campo pra eu poder sair a noite pra procurar (e raramente encontrar) animais, pela disposição em me ajudar a qualquer momento, mesmo tendo

sempre mil coisas pra fazer e outras pessoas pra ajudar, pelas dicas na realização das PCRs, por me apresentar o CodonCode e o FigTre, pelas sugestões de análises e pelas contribuições valiosas com os relatórios da FAPESP, resumos de congresso e por todas as sugestões, comentários e correções da dissertação!

Aos alunos do professor Miguel pela convivência, pelas risadas em campo, por me ensinarem a fixar e a identificar a espécie (ou pelo menos chutar com mais consciência) dos tantos sapos e lagartos das viagens de campo, e principalmente pela coleta dos lagartos que analisei durante esses anos! Agustin, Cassimiro, Dante, Felipe, Marco, Mauro, Pedro, Recoder, Zé Mário e Miguel, sem vocês, esse projeto simplesmente não seria viável! Em especial ao Mauro por me deixar ser sua sombra no campo, por sempre me incentivar sair a noite pra procurar os bichos (mesmo confundindo as luzes de Camacan com um predador a espreita!), pela disposição em me ajudar sempre, por ter cedido a maioria das fotos dos lagartinhos que apresento na dissertação, por todas as conversas, risadas e pela amizade.

À professora Lurdes Foresti por permitir que eu utilizasse o Laboratório de Ictiogenética para realização de parte deste projeto e pelo entusiasmo no desenvolvimento do meu projeto.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Ictiogenética: Anita, Carlos, Caroline, Felipe, Keila, Marilena, Pedrinho, Raquel, Ricardo e Riviane pelo convívio, conversas, risadas, ajudas e por me receberem de braços abertos para que eu pudesse realizar a parte molecular do mestrado.

Um agradecimento especial à amiga Keilinha por me ensinar a montar cariótipos no *Photoshop*, pela amizade, incentivo, risadas, saídas gastronômicas (humm, japonês, outback, cantina italiana do seu Paolo...), pela disposição em ajudar (sempre!!), pelos telefonemas contando novidades “bombásticas”, os desabafos e me acalmando em momentos de crises, pela ajuda com a dissertação e por tornar o dia a dia no laboratório incrivelmente agradável; e à amiga Reitchel pelas discussões sempre muito valiosas sobre os mais diversificados assuntos de citogenética, por se juntar com a Keilinha nas tentativas (frustradas) de FISH com sonda ribossomal dos lagartinhos, pela leitura atenta e contribuições importantes na dissertação e pela amizade. Vocês duas são muito especiais pra mim!!

À amiga Carol (Pipiiiiii), uma pessoa sem a qual boa parte desse mestrado não teria sido realizada!! Uma pessoa que, mesmo sendo de outro laboratório, me ensinou genética molecular e

que desde sempre contribuiu (e muito) no meu mestrado! Pips, meus sinceros agradecimentos por toda a sua ajuda durante os vários imprevistos laboratoriais que ocorreram (“uxalá!”), por toda a ajuda com a dissertação, por todos os momentos engraçados (e os trágico-cômicos também), por sempre ser uma amiga tão prestativa, por todas as bombinhas de gelo seco, longas conversas interurbanas, músicas bobas, bolo “pullman” com velas de aniversário, fotos com o rosto no scanner e, por tornar esses anos de trabalho tão agradáveis e produtivos! Além de grande colaboradora desse mestrado, tenho em você uma amiga muito especial.

À Claudinha e Karina (Pupis), duas pessoas muito queridas e especiais, pela amizade, risadas, conversas, saídas gastronômicas, palavras de incentivo e momentos divertidíssimos! Ao Tomás pela revisão dos resumos em inglês.

À Maíra e Sabrina, por toda a ajuda com a parte molecular, por terem cedido alíquotas de *primers*, DNA e algumas das sequências, pelas conversas na tentativa de desvendar os mistérios indecifráveis das PCR que não davam certo nem com as maiores simpatias. E ao Phillip Kok por ter cedido uma amostra de tecido de *Kaieuteurosaurus*.

À Ana Carolina Carnaval pelas discussões e sugestões de análises com relação aos meus dados. E à Roberta Damasceno pelas conversas e diversão garantida nas viagens de campo!

Ao Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, ao Instituto de Biociências e a todos os funcionários pela infraestrutura e oportunidade de realização do meu trabalho de mestrado. E à professora Regina Mingroni, coordenadora da pós graduação do Departamento.

À Deisy, Helenice, Helder, Érica, Cintia e Vera, pessoas maravilhosas. À vocês meu muito obrigada por toda a ajuda prestada (especialmente para a entrega da dissertação pra reunião da CCP em abril), por sempre estarem disponíveis.

À banca de qualificação, composta pela professora Lurdes Foresti, Maria José de Jesus Silva e Célia Koifmann, pelos comentários, questionamentos e contribuições para a finalização do mestrado.

Ao professor Vilela pela oportunidade inédita (e inusitada) de revisar um artigo na Revista da Biologia e pelas conversas enriquecedoras nos corredores e ponto de ônibus da Biologia.

À FAPESP pelo auxílio financeiro recebido, imprescindível para a realização deste projeto, permitindo participação em congressos, realização de cursos e compra de alguns reagentes. E ao CNPq e CAPES, que indiretamente permitiram minha participação em viagens de campo e desenvolvimento deste projeto. Ao IBAMA pelas licenças de coleta.

À gráfica Copybem do Instituto de Biociências pela compreensão e impressão (em tempo recorde) dos exemplares dessa dissertação. E ao Colégio Oswald de Andrade, pela flexibilidade em alguns momentos cruciais e pela convivência agradável com professores, alunos e funcionários.

À minha pequena, e às vezes complexa, família: Ester, Milton e Elaine. Obrigada pelo apoio, incentivo, pelas conversas e pela curiosidade no meu trabalho mesmo sem entender completamente o que eu fazia. Em especial a minha irmã. Laine, obrigada por toda a ajuda no período final do mestrado, com suas sugestões e opiniões sobre alguns capítulos e ajuda com as tabelas e digitações dos textos que escrevi durante as minhas viagens diárias para o trabalho ou de volta da USP. Amo muito vocês.

Ao Douglas, namorado e amigo, que me acompanhou desde o início do mestrado, ajudando com painéis de congresso, figuras de artigos e aula de qualificação. Meu muitíssimo obrigada por todo apoio, incentivo, algumas broncas necessárias, pela cumplicidade, paciência, preocupação, carinho, compreensão. Por estar sempre ao meu lado e me manter sempre de bom humor, por me acompanhar nas minhas “gordices” pré-depósito de dissertação, por amenizar os momentos difíceis, por todas as alegrias, ensinamentos e amor incondicional (mesmo com o meu lado meio “cisne negro” nessa fase). Nessa fase final de mestrado sua ajuda foi essencial, não só com a formatação da dissertação, mas pela companhia até de madrugada no fim de semana antes da entrega, por me acalmar e por contribuir para que tudo desse certo! Te amo muito!! Você torna minha vida ainda mais feliz e equilibrada! E não posso deixar de agradecer à sua família: dona Maria, seu José, Ricardo, Michele, dona Lurdes e a todos os tios, tias, primos e primas, por terem me acolhido com tanto carinho...

Às minhas amigas de longa data, muito queridas e que infelizmente não vejo com tanta frequência, mas que fizeram parte dessa etapa, sempre com palavras de apoio e incentivo: Andréa, Fernanda e Juliana. E à família de vocês por todo o carinho.

Aos amigos biólogos que sempre trocaram figurinhas comigo e sempre me apoiaram durante o mestrado: Rafael e Milene. Ao Rafa, meu amigo-irmão, pelas risadas, amizade, conversas e histórias engraçadíssimas no fretado, tornando a jornada diária de 3 horas no trânsito mais divertidas (“come on everybody...”). À Milene, uma amiga sempre presente embora geograficamente distante, pela amizade sincera e incondicional, pelas tantas conversas, visitas relâmpago, por todas as pequenas coisas muito significativas, e por fazer parte da minha vida por mais de 10 anos, compartilhando cada acontecimento, por mais desimportante que fosse!

Aos amigos de faculdade: Nani (Natália e Claudinho! afinal não dá pra pensar em um sem o outro!), Dani, Furacão (Gilda) e Farinha (Pedro) que foram o equilíbrio durante essa fase bastante corrida. Obrigada pela amizade, pelo incentivo (especialmente pra terminar logo o mestrado), pelas conversas, risadas e saídas “tbfíticas”. Obrigada por acompanharem esse caminho, nem sempre fácil, mas infinitamente mais agradável com a “baranguice” de vocês! E é claro que não podia deixar de agradecer às famílias de vocês pela hospitalidade durante as minhas pernoites após os eventos “tribufos”. Um agradecimento especial à querida família Rossi (Juliana, Marilena e Pedrinho) por todo o carinho e amizade.

À Talita, amiga que acompanhou o começo e o fim do mestrado, pelos ensinamentos, pelas risadas e conversas e ótimas lembranças nesses muitos anos de amizade. E à sua família (Dirce, Milton, Sayuri, Yuiti e Fabiano), que é muito especial pra mim.

E por fim, mas nem por isso menos importante, aos novos amigos: Michel (mais novo barango), Luiz, Kátia, Kelly, Will, Jana, Murilo, Melina, Shira, Maristela, Egídio, Maira, Zé, Mayara, Elaine, Jorginho, Renato, Scherk, Mônica, Van, Leo e Thiago, pelos momentos de descontração, reboladas no *nintendo-wii*, festas juninas, reuniões musicais com *band hero*, inimigo secreto, mergulhos, eventos gastronômicos e aniversários.

Obrigada a todos, vocês tornaram esta jornada possível.

Sumário

Resumo Geral	ii
Abstract	iii
Introdução Geral	01
Objetivos	32
Material e Métodos Geral	34
Capítulo 1 - Cariótipo da forma diplóide críptica unissexual de <i>Leposoma percarinatum</i> (Squamata, Gymnophthalmidae) e da espécie bissexual <i>Leposoma ferreirai</i> do baixo Rio Negro, Amazonas, Brasil	54
Capítulo 2 - Caracterização citogenética de espécies da tribo Ecleopodini (Gymnophthalmidae, Squamata)	67
Capítulo 3 - Relações evolutivas entre os lagartos da tribo Ecleopodini (Gymnophthalmidae, Squamata): uma abordagem molecular	87
Capítulo 4 - Descrição citogenética de <i>Scriptosaura catimbau</i> , novo gênero e espécie de microteídeo (Gymnophthalmidae, Squamata) e seu posicionamento na tribo Gymnophthalmini com base em dados moleculares.	115
Capítulo 5 - Descrição cariotípica de espécies pertencentes às tribos Heterodactylini e Iphisiini (Gymnophthalmidae, Squamata)	139
Considerações Finais	157
Anexo 1	161
Anexo 2	166
Anexo 3	172

Lista de Figuras

Figura 1: Hipóteses filogenéticas da Ordem Squamata Em (a) análise de Estes e col. (1988) a partir de caracteres osteológicos e anatômicos e em (b) análise de Vidal e Hedges (2009) a partir de nove regiões gênicas nucleares. O retângulo verde representa a infraordem Iguania, a vermelha representa Gekkota, a roxa representa Scincomporpha e a laranja representa Anguimorpha	04
Figura 2: Hipóteses filogenéticas da família Gymnophthalmidae. Em (a) análise de Máxima Verossimilhança de Pellegrino e col. (2001) utilizando os genes <i>c-mos</i> , 18S (nucleares), 12S, 16S e ND ₄ (mitocondriais), organizando a família em quatro subfamílias e quatro tribos. Em (b) análise Bayesiana de Castoe e col. (2004) utilizando os genes <i>c-mos</i> (nuclear), 12S, 16S e ND ₄ (mitocondriais), organizando a família em quatro subfamílias e duas tribos.	07
Figura 1.1. Cariótipos de espécies do gênero <i>Leposoma</i> da Estação Ecológica de Anavilhanas, Amazonas, Brasil. (a) <i>Leposoma percarinatum</i> , fêmea, 2n= 44 (20M+24m) e (b) <i>Leposoma ferreirai</i> , macho, 2n= 44 (20M+24m), após coloração convencional. (c) Ag-RONs localizadas na região terminal de um par de microcromossomos pequeno em <i>L. percarinatum</i> , evidenciando as Ag-RONs heteromórficas (esquerda) e homomórficas (centro) e em <i>Leposoma ferreirai</i> (direita). Bar = 10 mm.	61
Figura 1.2. Padrões pericentroméricos e teloméricos de bandamento C nas espécies <i>Leposoma</i> . (a) <i>Leposoma percarinatum</i> . (b) <i>Leposoma ferreirai</i>	61
Figura 2.1. Célula diplotênica de exemplar macho de <i>Dryadosaura nordestina</i> , com 24 bivalentes (10M+14m), o que sugere 2n= 48	75
Figura 2.2. Metáfase parcial com 45 cromossomos de exemplar macho de <i>Dryadosaura nordestina</i> , grande maioria composta por dois braços, inclusive os microcromossomos	75
Figura 2.3. Cariótipo de exemplar macho de <i>Colobosauroides carvalhoi</i> , com 2n= 44 (20M+24m). Em destaque, o par de microcromossomo portador das Ag-RONs	76
Figura 2.4. Metáfase de <i>Leposoma ferreirai</i> (2n= 44, 20M+24m) após a técnica de hibridação <i>in situ</i> fluorescente com sonda telomérica, evidenciando as marcações somente terminais	76
Figura 2.5. Metáfases parciais de <i>Arthrosaura kockii</i> (a), <i>Arthrosaura reticulata</i> (b), <i>Leposoma nanodactylus</i> (c) e <i>Leposoma annectans</i> (d). Metáfases (a) e (b) evidenciando cariótipos com divisão entre macrocromossomos e microcromossomos, metáfase (c)	

evidenciando cromossomos de morfologia acrocêntrica com redução gradual de tamanho, similar ao cariótipo de <i>L. scincoides</i> e (d) evidenciando alguns pares portadores de dois braços bem maiores do que os demais, que são acrocêntricos	77
Figura 3.1. Representantes de lagartos microteídeos da tribo Ecleopodini utilizados nas análises moleculares. Para as espécies <i>Arthrosaura kockii</i> , <i>Arthrosaura reticulara</i> , <i>Leposoma ferreirai</i> e <i>Leposoma percarinatum</i> também foram obtidos dados citogenéticos, apresentados nos capítulos 1 e 2 do presente trabalho.....	94
Figura 3.2. Representantes dos lagartos das tribos Cercosaurini (<i>Cercosaura ocellata</i> e <i>Placosoma glabellum</i>), Gymnophthalmi (<i>Scriptosaura catimbau</i> , analisada citogeneticamente e cujos dados encontram-se no capítulo 4) e da subfamília Alopoglossinae (<i>Alopoglossus angulatus</i>), utilizados como grupos externos à Ecleopodini...	95
Figura 3.3. Gráficos da frequência observada de transições (♦) e transversões (■) versus a distância genética estimada pelo modelo Tamura-Nei para (a) 16S, (b) citocromo <i>b</i> (c) ND ₂ (d) ND ₄ (e) <i>c-mos</i> e (f) NT ₃ , com seus respectivos coeficientes de regressão.....	99
Figura 3.4. – Reconstrução filogenética dos genes 16S, citocromo <i>b</i> , ND ₂ , ND ₄ , <i>c-mos</i> e NT ₃ concatenados com os valores de suporte de MP/MV/IB/índice de Bremer, respectivamente, utilizando a árvore de Inferência Bayesiana como modelo. Os valores de <i>bootstrap</i> abaixo de 50 foram representados pelo símbolo “-“ e todos os valores de probabilidade posterior foram apresentados	100
Figura 3.5 – Reconstrução filogenética do gene 16S com os valores de suporte de MP/MV/IB, respectivamente, utilizando a árvore de Inferência Bayesiana como modelo. Os valores de <i>bootstrap</i> abaixo de 50 foram representados pelo símbolo “-“ e todos os valores de probabilidade posterior foram apresentados	103
Figura 3.6 – Reconstrução filogenética do gene citocromo <i>b</i> , com os valores de suporte de MP/MV/IB, respectivamente, utilizando a árvore de Inferência Bayesiana como modelo. Os valores de <i>bootstrap</i> abaixo de 50 foram representados pelo símbolo “-“ e todos os valores de probabilidade posterior foram apresentados	104
Figura 3.7 – Reconstrução filogenética do gene ND ₂ , com os valores de suporte de MP/MV/IB, respectivamente, utilizando a árvore de Inferência Bayesiana como modelo. Os valores de <i>bootstrap</i> abaixo de 50 foram representados pelo símbolo “-“ e todos os valores de probabilidade posterior foram apresentados	105

Figura 3.8 – Reconstrução filogenética do gene ND ₄ , com os valores de suporte de MP/MV/IB, respectivamente, utilizando a árvore de Inferência Bayesiana como modelo. Os valores de <i>bootstrap</i> abaixo de 50 foram representados pelo símbolo “-“ e todos os valores de probabilidade posterior foram apresentados	106
Figura 3.9 – Reconstrução filogenética do gene <i>c-mos</i> , com os valores de suporte de MP/MV/IB, respectivamente, utilizando a árvore de Inferência Bayesiana como modelo. Os valores de <i>bootstrap</i> abaixo de 50 foram representados pelo símbolo “-“ e todos os valores de probabilidade posterior foram apresentados	107
Figura 3.10 – Reconstrução filogenética do gene NT ₃ , com os valores de suporte de MP/MV/IB, respectivamente, utilizando a árvore de Inferência Bayesiana como modelo. Os valores de <i>bootstrap</i> abaixo de 50 foram representados pelo símbolo “-“ e todos os valores de probabilidade posterior foram apresentados	108
Figura 4.1. Gráficos da frequência observada de transições (♦) e transversões (■) <i>versus</i> a distância genética estimada pelo modelo Tamura-Nei para (a) 16S, (b) ND ₄ , (c) <i>c-mos</i> (d) os três genes concatenados, com seus respectivos coeficientes de regressão	124
Figura 4.2. Reconstrução filogenética com base nas sequências concatenadas das regiões gênicas 16S, ND ₄ e <i>c-mos</i> . Os valores dos ramos correspondem respectivamente aos valores de <i>bootstrap</i> ou probabilidade posterior de MP/MV/IB. Os valores de <i>bootstrap</i> abaixo de 50 foram representados pelo símbolo “-“ e todos os valores de probabilidade posterior foram apresentados	125
Figura 4.3. Reconstrução filogenética com base nas sequências da região gênica mitocondrial 16S. Os valores dos ramos correspondem respectivamente aos valores de <i>bootstrap</i> ou probabilidade posterior de MP/MV/IB. Os valores de <i>bootstrap</i> abaixo de 50 foram representados pelo símbolo “-“ e todos os valores de probabilidade posterior foram apresentados	126
Figura 4.4. Reconstrução filogenética com base nas sequências da região gênica mitocondrial ND ₄ . Os valores dos ramos correspondem respectivamente aos valores de <i>bootstrap</i> ou probabilidade posterior de MP/MV/IB com partição por códon. Os valores de <i>bootstrap</i> abaixo de 50 foram representados pelo símbolo “-“ e todos os valores de probabilidade posterior foram apresentados.	127
Figura 4.5. Reconstrução filogenética com base nas sequências da região gênica nuclear <i>c-mos</i> . Os valores dos ramos correspondem respectivamente aos valores de <i>bootstrap</i> ou	

probabilidade posterior de MP/MV/IB. Os valores de <i>bootstrap</i> abaixo de 50 foram representados pelo símbolo “-“ e todos os valores de probabilidade posterior foram apresentados .	128
Figura 4.6. Cariótipo de exemplar fêmea de <i>Scriptosaura catimbau</i> , com $2n= 48$, sendo os quatro primeiros pares de dois braços. Em destaque, o par de cromossomos portador das Ag-RONs	130
Figura 4.7. Metáfase parcial de <i>Scriptosaura catimbau</i> após técnica de bandamento C, evidenciando grandes blocos de heterocromatina constitutiva nas regiões pericentroméricas dos cromossomos de dois braços e dos cromossomos acrocêntricos	130
Figura 4.8. Metáfases parciais de (a) <i>Scriptosaura catimbau</i> , (b) <i>Calyptommatus leiolepis</i> e (c) <i>Nothobachia ablephara</i> após a técnica de hibridação <i>in situ</i> com sonda telomérica. As setas brancas indicam as marcações intersticiais (ITS), presentes nos cromossomos de dois braços	131
Figura 4.9. Cariótipo de exemplar macho de <i>Calyptommatus leiolepis</i> (retirado de Yonenaga-Yassuda e col., 2005) em (a) e de exemplar fêmea de <i>Nothobachia ablephara</i> com cromossomos sexuais de macho no quadro em destaque (retirado de Pellegrino e col., 1999b) em (b)	131
Figura 5.1. Representantes das espécies pertencentes à tribo Heterodactylini (<i>Heterodactylus imbricatus</i> , <i>Heterodactylus lundii</i> , <i>Colobodactylus taunayi</i> e <i>Caparaonia itaiquara</i>) e à tribo Iphisiini (<i>Acratosaura mentalis</i> e <i>Alexandresaurus camacan</i>) analisadas citogeneticamente	146
Figura 5.2. Cariótipo de exemplar fêmea de <i>Acratosaura mentalis</i> , com $2n= 42$ (18M+24m). No retângulo em destaque, o par de microcromossomos portador das Ag-RONs em coloração convencional evidenciando as constrições secundárias (esquerda) e após coloração por nitrato de prata evidenciando as marcações na região distal do braço curto, na constrição secundária .	148
Figura 5.3. Cariótipo de exemplar fêmea de <i>Alexandresaurus camacan</i> , com $2n= 42$ (18M+24m). No retângulo em destaque, o par de microcromossomo portador das Ag-RONs .	149
Figura 5.4. Metáfase de <i>Colobodactylus taunayi</i> , macho, em coloração convencional, com número diplóide igual a 42 (18M+24m), à esquerda. À direita, metáfase em que foi	

realizada a técnica de Ag-RONs. Setas indicam o par portador das Ag-RONs em coloração convencional e o mesmo par corado com nitrato de prata em destaque as Ag-RONs	149
Figura 5.5. Cariótipo de <i>Heterodactylus imbricatus</i> , macho, em coloração convencional, com número diplóide igual a 42 (18M+24m). No retângulo em destaque o par portador das Ag-RONs ..	150
Figura 5.6. Cariótipo de exemplar fêmea de <i>Heterodactylus lundii</i> , com 2n= 41 (18M+23m). Neste cariótipo, é possível notar a falta de um dos microcromossomos do par 10	150
Figura 5.7. Cariótipo de <i>Caparaonia itaquara</i> , macho, em coloração convencional, com número diplóide igual a 42 (18M+24m). No retângulo em destaque o par portador das Ag-RONs.....	151
Figura 5.8. Metáfase de <i>Caparaonia itaquara</i> (a) e <i>Alexandresaurus camacan</i> (b) após a técnica de FISH com sonda telomérica. Em (a) é possível observar as marcações pericentroméricas em todos os macrocromossomos (a seta em verde evidencia o cromossomo acrocêntrico), enquanto em (b) só observam-se as marcações terminais	151

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Relação de espécies, tribo a qual pertencem, números de tombo do Laboratório de Citogenética de Vertebrados (LG) ou de campo (demais números), sexo e localidade dos exemplares analisados citogeneticamente	35
Tabela 2 - Relação das espécies, tribo/subfamília ao qual pertencem, localidade, genes amplificados (as condições de amplificação - A a K - relacionadas na Tabela 5 encontram-se entre parênteses), número dos exemplares (LG ou campo), utilizados nas análises moleculares da tribo Ecpleopodini. O símbolo “GB” se refere às sequências retiradas do GenBank (Tabela 3) e “*” às sequências doadas	38
Tabela 3: Relação das espécies, localidade, número dos exemplares e número de identificação do GenBank utilizados nas análises moleculares das tribos Gymnophthalmi e Ecpleopodini	39
Tabela 4: Descrição dos <i>primers</i> utilizados para cada um dos genes e tamanho do segmento amplificado	47
Tabela 5. Relação das condições utilizadas para as reações de PCR que constam na Tabela 2	48
Tabela 1.1. Número de identificação dos exemplares de cada espécie analisada (ID), número de metáfases com $2n=44$ do total de metáfases analisadas em coloração convencional (CC) e o número de metáfases analisadas após coloração por nitrato de prata (Ag-RON) nas duas espécies de <i>Leposoma</i> . As porcentagens (%) de RONS heteromórficas (Rr) e homomórficas (rr) são apresentadas	62
Tabela 2.1: Relação de espécies, número de registro do Laboratório de Citogenética de Vertebrados (LG) ou número de campo, sexo e procedência dos exemplares da tribo Ecpleopodini analisados citogeneticamente	73
Tabela 3.1. Composição nucleotídica, razão entre as transições e tranversões e valores obtidos pelo método de reconstrução de Máxima Parcimônia para as análises dos genes individuais e para as análises dos seis genes concatenados, utilizando todos os exemplares que foram amplificados.	101

Tabela 4.1. Resultados das análises dos genes 16S, ND ₄ e <i>c-mos</i> isolados e da análise concatenada dos três genes sob o critério de Máxima Parcimônia (tratando <i>gaps</i> como quinto estado)	123
Tabela 5.1 – Relação de espécies, número de tombo do Laboratório de Citogenética de Vertebrados dos exemplares, sexo e localidade dos animais analisados citogeneticamente.	145

Resumo e Abstract

Os dados obtidos neste trabalho contribuem para o conhecimento da família Gymnophthalmidae, acrescentando dados genéticos de três novos genes para a tribo Ecleopodini e descrição de 11 novos cariótipos para a família, pertencentes às tribos Ecleopodini, Heterodactylini, Iphisiini e Gymnophthalmini.

As análises filogenéticas obtidas para a tribo Gymnophthalmini pretenderam investigar o posicionamento de *Scriptosaura catimbau*, espécie descrita recentemente que apresenta $2n=48$, que foi recuperada como grupo irmão de *Nothobachia ablephara*, relacionados ainda à *Calyptommatus*. Já em Ecleopodini, as análises foram realizadas para a investigação das relações filogenéticas entre os gêneros da tribo e do posicionamento de *Kaieusosaurus hindsii*. Foi recuperado o monofiletismo da tribo e do clado composto pelos gêneros *Anotosaura*, *Dryadosaura* ($2n=44$, $20M+24m$) e *Colobosauroides* ($2n=44$, $20M+24m$), entretanto, as relação entre os demais gêneros, inclusive de *Kaieusosaurus*, não puderam ser estabelecidas e, com base nos dados citogenéticos, nota-se o predomínio de cariótipos com divisão entre macro e microcromossomos.

Apesar de a família Gymnophthalmidae apresentar uma elevada diversidade cariotípica, as tribos Heterodactylini e Iphisiini apresentaram um cariótipo altamente conservado, sendo que as oito espécies descritas apresentam cariótipos compostos por 42 cromossomos com divisão clara entre macro e microcromossomos ($18M+24m$) e Ag-RONs em um par de microcromossomos. Os motivos que contribuem para a manutenção deste número diplóide nessas tribos ainda deverão ser investigados, mas aparentemente, este pode ser o cariótipo ancestral para a subfamília Gymnophthalminae e teria originado a diversidade cariotípica da tribo Gymnophthalmini por ocorrência de eventos de fissão e fusão cêntrica.

Novos estudos cariotípicos e moleculares devem ser conduzidos para estabelecimento de tendências cromossômicas e evolutivas na tribo Ecleopodini, que parece apresentar uma divergência rápida e simultânea, e para um melhor conhecimento da família que apresenta uma diversidade cromossômica elevada e sistemática longe de estar bem estabelecida.

This study contributes to knowledge of the family Gymnophthalmidae, adding new genetic data of three genes for the tribe Ecpleopodini and description of 11 new karyotype for the family, belonging to the tribes Ecpleopodini, Heterodactylini, Iphisiini and Gymnophthalmini.

Phylogenetic analysis for the tribe Gymnophthalmini aimed to investigate the position of *Scriptosaura catimbau*, recently described species which has $2n = 48$ and was recovered as sister group of *Nothobachia ablephara*, both related to *Calyptommatus*. In Ecpleopodini, the analysis was performed to investigate the phylogenetic relationships among genera of the tribe and the placement of the species *Kaieusosaurus hindsii*. It was recovered the monophyly of the tribe and a clade composed of the genera *Anotosaura*, *Dryadosaura* ($2n = 44$, $20M+24m$) and *Colobosauroides* ($2n = 44$, $20M+24m$), however, the relationship among other genera, including *Kaieusosaurus*, could not be established and, based on cytogenetic data, it can be seen the predominance of karyotype with a division into macro and microchromosomes.

Although the family gymnophthalmids exhibit a high karyotypic diversity, the tribes and Heterodactylini Iphisiini showed a conservative karyotype, and the eight described species present karyotypes composed of 42 chromosomes with a clear division between macro and microchromosomes ($18M + 24 m$) and Ag-NORs in a pair of microchromosomes. The reasons that contributed to the maintenance of this diploid number in the two tribes are still to be investigated, but apparently, this may be the ancestral karyotype for the subfamily Gymnophthalminae and may have originated the karyotypic diversity in the Gymnophthalmini for a series of fission events centric.

New karyotypic and molecular studies should be conducted to establish trends in chromosomal and evolution in the tribe Ecpleopodini, which seems to have a simultaneous and rapid divergence, and to a better understanding of the family that has a high diversity and systematic chromosome far from well established.

Introdução Geral

A ordem Squamata possui cerca de 8200 espécies (Vidal e Hedges, 2009) divididas em quatro subordens: Serpentes, Amphisbaenia, Dibamidae e Lacertilia, e apresenta como sinapomorfias, entre outras características, a presença de hemipênis, órgão de Jacobson separado da cavidade nasal e cloaca transversal (Pough e col., 2001). Embora seja uma ordem diversificada, grande parte dos trabalhos está voltada para as áreas de taxonomia e sistemática, esta última crescendo bastante nos últimos anos com a utilização de dados moleculares, entretanto, as relações filogenéticas entre as subordens não estão totalmente compreendidas.

A subordem Lacertilia é composta por cerca de 4900 espécies (Vidal e Hedges, 2009), divididas em quatro infraordens: Iguania, Gekkota, Scincomorpha e Anguimorpha (Pough e col., 2001) e apresenta uma sistemática bastante controversa, não existindo consenso com relação ao número atual de famílias. Pough e col. (2001) consideram 17 famílias enquanto Frost e col. (2001) e Schulte e col. (2003) consideram pelo menos trinta famílias, devido à elevação das subfamílias de Iguanidae para a categoria de família. Destas, seis são exclusivamente neotropicais e outras, com distribuição mais ampla, apresentam gêneros endêmicos à região Neotropical.

Os lagartos compõem um grupo bastante diverso com ocorrência em todos os continentes, exceto em regiões árticas. Apresentam elevada diversidade ecológica com hábitos terrestres, arborícolas, aquáticos e fossoriais; ampla diversidade de padrões de coloração (utilizada como camuflagem, comunicação intraespecífica, mimetismo ocasional e outros); grande variação de tamanho, com o menor lagarto (*Sphaerodactylus ariasae* – República Dominicana) medindo 16 mm (Hedges e Thomas, 2001) e o maior (*Varanus komodoensis*, o dragão de Komodo – Indonésia) ultrapassando três metros de comprimento (Auffenberg, 1981).

Além disso, podem apresentar diversas modificações morfológicas e comportamentais que lhes conferem adaptações a diferentes habitats: lagartos fossoriais apresentam o corpo alongado e redução dos membros; os lagartos que habitam os desertos enterram-se na areia, onde a difusão térmica é menor, mantendo as temperaturas mais amenas durante o dia e não tão baixas durante a noite (Packard e Packard, 1988), ou reduzem a superfície corporal em contato com o substrato quente,

como o lagarto *Meroles* em que a diminuição da absorção de calor é dada pela troca das patas em contato com o solo (Louw e Holm, 1972).

A sistemática dessa Ordem sofreu diversas modificações nos últimos anos e as relações entre os grupos passaram a ser melhor estabelecidas com a utilização de dados moleculares. Estudos baseados em caracteres osteológicos e anatômicos recuperam uma divisão dos Squamata em dois grupos: Iguania e Scleroglossa (Estes e col., 1988; Lee, 1998; Lee e Caldwell, 2000). Essa divisão tem sido associada a diferenças na estrutura da língua e comportamento alimentar, sendo que em Iguania a língua é utilizada para captura de presas, enquanto em Scleroglossa as mandíbulas e os dentes são utilizados para esse fim, liberando a língua para quimiorrecepção (Vitt e col., 2003; Townsend e col., 2004; Vidal e Hedges, 2005).

A hipótese filogenética proposta por Estes e col. (1988) com base em dados morfológicos, além de recuperar a divisão entre Iguania e Scleroglossa, recupera quatro infraordens monofiléticos: Iguania, Anguimorpha, Scincomorpha e Gekkota, sendo a primeira basal com relação às demais (Fig. 1a). As serpentes, os dibamídeos e as anfisbenas têm posição incerta, mas sugere-se que esses três grupos deveriam estar relacionados, uma vez que apresentam inúmeros caracteres morfológicos em comum, como a redução dos membros. Embora seja uma característica utilizada para estabelecer a proximidade entre os animais sem membros locomotores desenvolvidos, a redução de membros constitui uma convergência morfológica, surgindo independentemente pelo menos 62 vezes nos Squamata, segundo estimativas de Pough e col. (2001), e diversas vezes dentro de uma única família, como em Gymnophthalmidae, por exemplo, em que a redução ocorreu pelo menos cinco vezes independentemente (Pellegrino e col., 2001).

Trabalhos recentes investigando a filogenia dos Squamata com base em dados moleculares (Saint e col., 1998; Harris e col., 2001; Townsend e col., 2004; Vidal e Hedges, 2005, 2009) não recuperaram a divisão clássica dos Squamata em Iguania e Scleroglossa nem as mesmas relações entre as infraordens. Em 2005, Vidal e Hedges utilizaram dados de nove regiões do genoma nuclear e encontraram topologias similares a outros trabalhos, como o de Townsend e col. (2004).

Figura 1: Hipóteses filogenéticas da Ordem Squamata. Em (a) análise de Estes e col. (1988) a partir de caracteres osteológicos e anatômicos e em (b) análise de Vidal e Hedges (2009) a partir de nove regiões gênicas nucleares. O retângulo verde representa a infraordem Iguania, o vermelho representa Gekkota, o rosa representa Scincomorpha e o laranja representa Anguimorpha.

Diferentemente da filogenia obtida com base em dados morfológicos (Estes e col., 1988), Townsend e col. (2004) e Vidal e Hedges (2005) recuperam Gekkota em posição basal com relação aos demais lagartos e as anfisbenas como grupo-irmão de Lacertidae. Além disso, Vidal e Hedges (2005) posicionam Dibamidae como basal dentro da Ordem, as serpentes agrupam-se com Iguania e Anguimorpha em uma politomia (Fig. 1b).

A sistemática de Squamata está em constante revisão, especialmente com a utilização dos dados moleculares, e permitiu a constatação de que diversos níveis hierárquicos apresentam-se como merofiléticos, como Scincomorpha, Scleroglossa ou mesmo Lacertilia, como proposto por Townsend e col. (2004) e Vidal e Hedges (2005, 2009), com a inclusão de Amphisbaenia como grupo irmão de Lacertidae e constatação de que os lagartos compõem um grupo sem sinapomorfias que os separe dos demais Squamata. Diversos trabalhos têm utilizado dados de diferentes naturezas (moleculares, morfológicos, citogenéticos, bioquímicos) e embora haja controvérsia sobre a utilização de caracteres distintos em análises concatenadas (Huelsenbeck e col., 1996), uma análise individual dos dados pode apontar incongruências e auxiliar na proposta de filogenias mais robustas (Sites e col., 1996).

I.1. Família Gymnophthalmidae – Características gerais

A família Gymnophthalmidae é composta por lagartos de pequeno porte, cujo comprimento rostro-cloacal varia de 4 a 20 cm, habitam o folheto das florestas tropicais e subtropicais ou encontram-se ocultos junto à vegetação rasteira das áreas abertas da América do Sul, Central e Antilhas (Rodrigues, 1995). São, na sua maioria, terrestres, e podem ocorrer desde o nível do mar a mais de 3500m de altitude e algumas das tendências encontradas na família incluem a redução dos membros, perda de pálpebra, alongamento do corpo, além da presença de outros caracteres associados ao hábito fossorial (Rodrigues, 1995).

A primeira classificação taxonômica da família Gymnophthalmidae (infraordem Scincomorpha) foi proposta por Boulenger (1885). Nessa classificação, as famílias Teiidae e Gymnophthalmidae eram consideradas uma única família, Teiidae, dividida em quatro grupos

baseados na morfologia externa, diagnosticados pelo padrão de escamação da cabeça, presença ou ausência de abertura timpânica, redução dos membros e alongamento do corpo. Posteriormente, Maclean (1974) realizou um estudo utilizando caracteres anatômicos e, como resultado, obteve dois grupos que não compartilhavam sinapomorfias para serem considerados como um único grupo natural, dividindo os Teiidae em duas subfamílias: (1) Teiinae: composta por lagartos do grupo I segundo a classificação de Boulenger (1885), que apresentam um maior tamanho corpóreo, as escamas nasais em contato e membros bem desenvolvidos, e (2) Gymnophthalminae: composta por lagartos dos grupos II, III e IV da classificação de Boulenger (1885), que apresentam menor tamanho corpóreo, e apresentam escamas nasais separadas por uma ou mais escamas frontonasais.

Presch (1980) propôs então uma filogenia para esses lagartos, baseada em caracteres miológicos e osteológicos, que permitiu o estabelecimento das subfamílias Teiinae (macroteídeos) e Gymnophthalminae (microteídeos) como monofiléticas, elevando as subfamílias à categoria de famílias em 1983. Pellegrino e col. (2001) e Castoe e col. (2004) corroboraram o monofiletismo dos microteídeos a partir de dados moleculares.

A primeira tentativa de organização sistemática da família, até então separada em três grupos (II a IV da classificação de Boulenger (1885)) com base em caracteres morfológicos, foi realizada por Pellegrino e col. em 2001 utilizando os genes *c-mos*, 18S (nucleares), 12S, 16S e ND₄ (mitocondriais) e amostrando 26 dos 37 gêneros da família. A espécie *Anotosaura brachylepis* se posiciona como basal com relação à subfamília Gymnophthalminae, sendo renomeada para *Rhachisaurus brachylepis* e alocada em uma subfamília própria Rhachisaurinae. Os 26 gêneros amostrados foram organizados em quatro subfamílias (Rhachisaurinae, Alopoglossinae, Gymnophthalminae e Cercosaurinae) e quatro tribos (Eupleopodini e Cercosaurini - subfamília Cercosaurinae - e Gymnophthalmini e Heterodactylini - subfamília Gymnophthalminae) (Fig.2a).

Com essa filogenia molecular, fica evidente que caracteres morfológicos associados ao hábito fossorial (alongamento do corpo, perda de pálpebras e da abertura do ouvido externo, e redução dos membros) surgiram independentemente diversas vezes dentro da família (Pellegrino e col., 2001).

Figura 2: Hipóteses filogenéticas da família Gymnophthalmidae. Em (a) análise de Máxima Verossimilhança de Pellegrino e col. (2001) utilizando os genes *c-mos*, 18S (nucleares), 12S, 16S e ND₄ (mitocondriais), organizando a família em quatro subfamílias e quatro tribos. Em (b) análise Bayesiana de Castoe e col. (2004) utilizando os genes *c-mos* (nuclear), 12S, 16S e ND₄ (mitocondriais), organizando a família em quatro subfamílias e duas tribos.

A convergência desses caracteres, juntamente com a dificuldade de coleta de alguns espécimes, contribui para que essa família esteja distante de ser taxonomicamente bem conhecida (Pellegrino e col., 2001; Rodrigues, 1995). Dessa forma, é imprescindível a combinação de diferentes conjuntos de dados, tais como moleculares e citogenéticos, os quais, aliados às informações morfológicas, devem contribuir para uma melhor compreensão das relações filogenéticas da família e para verificação de homoplasias, o que poderia ocasionar uma classificação artificial, como têm ocorrido com diversos gêneros, que têm se mostrado merofiléticos.

Embora o trabalho de Pellegrino e col. (2001) seja bastante representativo e tenha sido o primeiro com o intuito de organização sistemática da família, a classificação em subfamílias e tribos, e as relações filogenéticas entre os diversos níveis hierárquicos ainda são bastante controversas.

Pellegrino e col. (2001) consideram quatro subfamílias e quatro tribos, a subfamília Rhachisaurinae como grupo irmão de Gymnophthalminae, esse clado como grupo irmão de Cercosaurinae, sendo Alopoglossinae recuperada como basal dentro da família (Fig.2a). Já Castoe e col. (2004) apresentaram uma filogenia com os mesmos genes que Pellegrino e col. (2001) exceto o gene nuclear 18S, que não consideram informativo, e recuperam duas tribos (Bachini e Cercosaurini) e quatro subfamílias (Alopoglossinae, Rhachisaurinae, Ecpleopodinae e Gymnophthalminae). Alopoglossinae foi recuperado como basal dentro da família, as tribos Bachini e Cercosaurini recuperadas em um clado monofilético tendo como grupo irmão o clado composto por Rhachisaurinae e Gymnophthalminae, sendo Ecpleopodinae basal com relação a esse grande clado (Fig. 2b). Por dados morfológicos posteriores a esses dois trabalhos terem sido mais favoráveis a classificação proposta por Pellegrino e col. (2001), esta será a classificação adotada, sendo feitas considerações sobre a filogenia de Castoe e col. (2004) quando necessárias.

Embora bastante diversa, contando atualmente com cerca de 180 espécies alocadas em 45 gêneros, a família Gymnophthalmidae possivelmente apresenta uma diversidade bastante subestimada, como sugere a descrição frequente de novos gêneros e espécies, principalmente com a utilização de dados moleculares em associação aos morfológicos e com as pesquisas de levantamento

faunístico em diversas regiões do país, que têm tido grande impacto para o conhecimento sobre a família. Na década de 90, foram descritos cinco novos gêneros endêmicos da região das dunas interiores do Rio São Francisco que apresentaram adaptações até então desconhecidas na América do Sul (Rodrigues e Juncá, 2002).

Desde 2001, o número de gêneros reconhecidos e formalmente descritos passou de 37 (Pellegrino e col., 2001) para o número atual (45) com a descrição dos gêneros *Acratosaura*, *Adercosaurus*, *Alexandresaurus*, *Caparaonia*, *Dryadosaura*, *Kaieteurosaurus*, *Pantepuisaurus* e *Scriptosaura* (Kok, 2005, 2009; Myers e Donnelly, 2001; Rodrigues e Santos, 2008; Rodrigues e col., 2005, 2007, 2009), seja por descrição de exemplares recém coletados (como *Scriptosaura catimbau*) ou análise de animais já coletados que apresentaram diferenças significativas com relação aos gêneros e espécies aos quais eram associados (como *Colobosaura mentalis*, renomeada para *Acratosaura mentalis*).

O aumento do número de trabalhos com abordagens moleculares, filogeográficas e morfológicas, o aumento de coletas, melhora dos métodos de captura de microteídeos e, conseqüentemente, a melhora da amostragem e de exemplares disponíveis para análise têm contribuído bastante para o melhor conhecimento da riqueza e diversidade de gêneros e espécies desta família. Entretanto, dados sobre a distribuição geográfica dos microteídeos e diversidade de formas subterrâneas, fossoriais e menos abundantes permanecem desconhecidos (Delfim e Freire, 2007).

1.2. Estudos citogenéticos e evolução cariotípica

Trabalhos de abordagem citogenética ainda não são muito numerosos e, com base na última revisão cromossômica realizada por Olmo em 2005, estima-se que cerca de 20% das espécies da classe Reptilia e 15% da ordem Squamata tenham sido descritas citogeneticamente. Embora esse número seja relativamente baixo quando comparado com os dados disponíveis para os demais grupos de vertebrados, foi possível notar uma razoável variação no número diplóide: em serpentes a variação é de 24 a 52 cromossomos (Olmo, 2005; Olmo e Signorino, 2005); em anfisbenas de 26 a 50 (Huang e col., 1967; Huang e Gans, 1971), em lagartos de 16 a 64 (Schmid e col., 1994; Pellegrino e

col., 1999b) e entre os dibamídeos apenas uma espécie teve o cariótipo descrito apresentando 36 cromossomos (Cole e Gans, 1997).

Olmo e col. (2002) compararam os cariótipos e genomas dessa ordem com as demais de Reptilia e constataram que Squamata apresenta cariótipos mais variados, tanto em morfologia quanto em número diplóide, apresentando genomas menores e altas taxas de evolução cromossômica, diferentemente dos crocodilos e tartarugas, os quais apresentam morfologia dos macrocromossomos bastante conservada por padrões de bandamento G e baixas taxas de alteração cromossômica, além de possuírem genomas maiores pelo acúmulo de sequências repetitivas.

De acordo com a revisão cromossômica de Olmo (2005) nota-se que a maior variação de número diplóide é encontrada nas famílias Teiidae, Gymnophthalmidae e Lacertidae ($2n = 30$ a 64), que também apresentam a maior porcentagem de espécies descritas e a espécie com o maior número diplóide dentre os lagartos, *Nothobachia ablephara*, com variação de $2n = 62$ a 64 , devido a cromossomos supernumerários (Pelligrino e col., 1999b). Gekkota apresenta a segunda maior variação no número diplóide ($2n = 16$ a 46), contendo a espécie com o menor número diplóide (*Gonatodes taniae* com $2n = 16$, Schmid e col., 1994). Iguania apresenta inúmeras famílias com número cromossômico relativamente conservado e com a maioria das espécies apresentando número diplóide igual a 36 cromossomos ($12M+24m$) (Olmo, 2005).

Com a descrição de cariótipos de cerca de 20% das espécies de lagartos (Olmo, 2005), foi possível observar algumas tendências de diferenciação cromossômica, de forma que os cariótipos podem ser constituídos por macro- e microcromossomos ou por cromossomos que apresentam uma redução gradual de tamanho, cuja morfologia predominante é acrocêntrica e subtelocêntrica.

A determinação sexual nos répteis pode ser ambiental ou genotípica. Na determinação ambiental, a temperatura de incubação dos ovos é o agente que determina o sexo dos embriões, influenciando a expressão gênica e, dessa forma, o desenvolvimento das gônadas. Enquanto na determinação genotípica, o sexo do embrião é definido no momento da fertilização em consequência da presença de genes específicos, que podem estar concentrados em um par de cromossomos, podendo ainda ser morfologicamente distintos (Modi e Crews, 2005). Em lagartos já foram identificados

mecanismos de determinação sexual com cromossomos morfologicamente distintos do tipo simples XX:XY e ZZ:ZW, como em *Enyalius bilineatus* e *Phyllodactylus marmoratus*, respectivamente (Bertolotto e col., 2002; King e Rofe, 1976) e do tipo múltiplo $X_1X_1X_2X_2:X_1X_2Y$ como em *Polychrus acutirostris* (Bertolotto e col., 2001) e *Calyptommatus* (Yonenaga-Yassuda e col., 2005).

Os cromossomos B (ou supernumerários) podem segregar-se independentemente, não apresentando comportamento mendeliano, e apesar de sua função ainda ser desconhecida, a presença desses cromossomos pode tornar-se vantajosa, uma vez que aumenta a recombinação (Cavallaro e col., 2000). A última revisão de cromossomos B em lagartos, realizada por Bertolotto e col. em 2004, lista 15 espécies que apresentam esses cromossomos, sendo que seu número não ultrapassa quatro. Poucos estudos utilizaram coloração diferencial para caracterizar a natureza desses cromossomos, no entanto, os exemplares analisados mostraram esses cromossomos sendo de replicação tardia embora o padrão de bandamento C pudesse variar.

Algumas espécies de lagartos apresentam euploidias, com representantes triploídes e mais raramente tetraploídes (Lowe e col., 1970; Neaves, 1971). Muitas dessas espécies também são descritas como partenogénéticas, sendo esse mecanismo uma tentativa de contornar possíveis problemas de pareamento meiótico e formação de gametas. A partenogênese foi registrada para cerca de 40 espécies dentro da Ordem Squamata e o mecanismo pode ter origem espontânea ou origem híbrida.

Uma elevada variação inter-específica é observada após a aplicação de técnicas de coloração diferencial (bandamento C, RONS, bandamentos longitudinais). Levando em consideração a variação citogenética, não somente em lagartos como em todos os grupos de vertebrados, não é difícil imaginar que os cromossomos constituem uma fonte de dados interessante para o estabelecimento de padrões de evolução de espécies próximas e que alterações cromossômicas podem estar relacionadas com a especiação. Entretanto, é preciso estabelecer as homeologias entre os cromossomos de diferentes espécies para que se torne possível a comparação entre as características, e notar que número, fórmula cariotípica e morfologia dos cromossomos não constituem caracteres confiáveis isolados, uma vez que existe dificuldade em se polarizar os caracteres e garantir homologia dos eventos que originam um mesmo número diplóide.

Algumas hipóteses têm sido propostas para explicar as causas da variabilidade cromossômica. Alguns estudos, como o modelo de canalização elaborado por Bickham e Baker (1979), propõem que a variabilidade cromossômica seria consequência de pressões seletivas, para promover o estabelecimento do chamado “cariótipo ótimo”. Baseado neste modelo, imediatamente após uma linhagem quebrar uma zona adaptativa, a evolução cromossômica seria mais rápida e caracterizada por rearranjos não-Robertsonianos. As taxas de evolução cromossômicas se tornariam mais lentas com o passar do tempo, com a prevalência de rearranjos Robertsonianos sobre os não-Robertsonianos até ser atingido o estágio de estabilidade cariotípica como resultado do estabelecimento do “cariótipo ótimo”.

Entretanto, estas propostas foram criticadas por vários autores (King, 1985; Sites e Moritz, 1987), devido ao fato de que o papel adaptativo das alterações cromossômicas não apresenta suporte experimental e não explicar a evolução cromossômica em alguns táxons, como ordem Testudines e Chiroptera, pela natureza dos rearranjos cromossômicos em cada estágio do modelo de canalização, entre outros motivos (Patton e Sherwood, 1983; King, 1985). Outras hipóteses sugerem que a variabilidade dependeria de fatores intrínsecos da estrutura dos cromossomos que poderiam ou não favorecer o surgimento e conservação de mutações.

Mutações cromossômicas poderiam contribuir para prevenir introgressão gênica entre espécies que se diferenciaram por alopatria, de acordo com o modelo de King (1985) de especiação cromossômica alopátrica. Algumas alterações cromossômicas podem ter um impacto significativo no isolamento reprodutivo e podem contribuir para o processo de especiação, ao criarem barreiras ao fluxo gênico (Sites e Moritz, 1987; Riesenber, 2001). Quanto mais eficientes forem as alterações cromossômicas atuando como barreira ao fluxo gênico, menor a probabilidade de que ela sobreviva e se fixe dentro da população (Sites e Moritz, 1987). Cada fusão cêntrica pode causar pouca ou nenhuma disrupção da meiose, e então fixa-se por fraca deriva genética em populações de tamanho moderado.

O papel das alterações cromossômicas como barreiras ao fluxo gênico torna-se evidente em contato secundário das populações que estão fixadas para fusão de diferentes combinações de braços cromossômicos (Sites e Moritz, 1987). Neste caso, os híbridos terão fertilidade reduzida devido à segregação aberrante de multivalentes na meiose (Sites e Moritz, 1987).

Diversos estudos mostraram que repetições teloméricas intersticiais podem atuar como sítios frágeis e *hotspots* para rearranjos cromossômicos (Bouffler e col., 1993; Day e col., 1998; Peitl e col., 2002). Existem também evidências que, em algumas espécies de mamíferos, sítios teloméricos intersticiais (ITS) funcionam como *hot spots* de recombinação (Ashley e col., 1993; Day e col., 1998; Galkina e col., 2005), gerando alta variabilidade cariotípica.

Um estudo bastante interessante foi realizado por Dobigny e col. (2004) que aborda a construção de filogenia utilizando dados cariotípicos, propondo três procedimentos para a elaboração da matriz a ser utilizada para reconstruir uma hipótese filogenética: (a) presença ou ausência de um cromossomo inteiro; (b) cromossomos como caracteres e rearranjos como estados; (c) rearranjos cromossômicos como caracteres. Procedendo a análise, os autores notaram que os números diplóide e fundamental não recuperaram as relações de parentesco entre oito espécies com as quais estavam trabalhando. A reconstrução do cariótipo ancestral utilizando a premissa que o estado ancestral é o mais frequente também resultou em conclusões equivocadas. Considerando os cromossomos como caracteres, as reconstruções filogenéticas apresentaram-se inacuradas, entretanto, utilizando os rearranjos cromossômicos como caracteres foi obtida uma hipótese mais parcimoniosa com a história dos grupos.

Não há dúvida de que os cromossomos são caracteres poderosos para inferências de relações filogenéticas, entretanto, são incapazes de fornecer resolução dentro de grupos muito conservados e perdem resolução quando muitos eventos homoplásicos estão envolvidos. Homologias podem ser acessadas por bandamentos ou pintura cromossômica (Dobigny e col., 2004), esta última tem se mostrado bastante interessante por sugerir que os rearranjos cromossômicos são muito mais complexos do que é retratado pelas técnicas de bandamento longitudinal (Ventura e col., 2010).

Estudos citogenéticos em Gymnophthalmidae

Dentro da subordem Lacertilia, existem famílias que apresentam cariótipos relativamente conservados entre espécies, gêneros e subfamílias, como Tropiduridae (cujo número diplóide se

mantém constante, mas com alguns padrões espécie-específicos após aplicação de técnicas de coloração diferencial) e Teiidae (cuja variação existe, mas é possível estabelecer caracteres específicos a certos clados), e famílias cuja variação cariotípica é elevada, como Gymnophthalmidae (Bertolotto e col., 1996; Kasahara e col., 1996; Pellegrino e col., 1994, 2001; Santos, 2007; Yonenaga-Yassuda e col., 1988, 1995, 1996, 2005).

A família Gymnophthalmidae apresenta uma série de características interessantes do ponto de vista citogenético, apesar de poucas serem as espécies com cariótipos descritos. Os dados para a família ainda são escassos, tendo aumentado significativamente a partir da década de 90 com trabalhos realizados pelo grupo da professora Dra. Yatiyo Yonenaga-Yassuda do IBUSP-SP. As espécies de gimnophthalmídeos com cariótipo descrito passaram de oito para cerca de 40 espécies (Anexo 1). Grande parte em coloração convencional e técnicas rotineiras de coloração diferencial (Ag-RONs e bandamento C) devido ao tamanho reduzido dos animais, dificuldade em coletar algumas espécies, ao baixo índice mitótico e dificuldade em manter culturas de fibroblastos.

Embora pouco mais de 20% dos cariótipos sejam conhecidos, é possível observar à primeira vista a ausência de um padrão cariotípico evidente e presença de elevada diversidade cromossômica em microteídeos. A família apresenta números diplóides que variam de $2n = 32$ (18M+14m) em *Bachia dorbignyi* a $2n = 62-64$ (devido à presença de cromossomos supernumerários) em *Nothobachia ablephara* (Pellegrino e col., 1999b, 2001) e a diversidade cromossômica provavelmente é resultante de rearranjos cromossômicos envolvendo os macrocromossomos, sendo que os microcromossomos geralmente se mantêm constantes e em número igual a 24, exceto em *Bachia dorbignyi* (14), *Gymnophthalmus pleii* (22), *Anadia bitaeniata* e *Pholidobolus montium* (26) e *Bachia bresslaui* e *Dryadosaura nordestina* (28) (Cole e col., 1990; Gorman, 1970; Pellegrino, 1998; Pellegrino e col., 2001). Na tribo Gymnophthalmini, que apresenta diversos gêneros endêmicos das dunas do Rio São Francisco, encontram-se os maiores números diplóides e Yonenaga-Yassuda e col. (2005) sugerem que a evolução cariotípica ocorreu por uma série de eventos de fissão cêntrica, originando os cariótipos em redução gradual de tamanho com predomínio de subtelo/acrocêntricos.

Espécies de um mesmo gênero apresentam cariótipos bastante distintos como no gênero *Placosoma* (*P. cordylinum* apresentando $2n= 44$, $20M+24m$ e *P. glabellum* com $2n= 58$); espécies pertencentes a gêneros e até mesmo tribos distintas podem apresentar o mesmo número diplóide e fórmula cariotípica (*Placosoma cordylinum* - Cercosaurini, *Leposoma guianense* - Ecpleopodini e *Gymnophthalmus leucomystax* - Gymnophthalmini, $2n=44$, $20M+24m$); e os maiores números diplóides são aqueles em que não se observa divisão entre macro e microcromossomos e estão concentrados na tribo Gymnophthalmini (Pellegrino e col., 2001).

A descrição dos cariótipos com base em técnicas de coloração diferencial (banda C, banda R, Ag-RONs e FISH), com uma análise mais detalhada, possibilitou a elaboração de hipóteses acerca da evolução cromossômica em alguns clados, e em diversos casos, constituem caracteres que permitem a identificação e diferenciação das espécies.

A região organizadora de nucléolo (RON) é um dos sítios cromossômicos mais estudados e é constituída por sequências de genes ribossomais (rDNA) repetidas em *tandem*, sendo uma região susceptível a permutas desiguais, duplicações ou deleções. Em microteídeos essas regiões são variáveis, podendo estar localizadas em um único par cromossômico (*Procellosaurinus erythrocercus*, *Leposoma osvaldoi*) ou em múltiplos pares (*Vanzosaura rubricauda*, *Nothobachia ablephara*), tanto em macrocromossomos (*Leposoma osvaldoi*) quanto em microcromossomos (*Procellosaurinus erythrocercus*), podendo ainda ser heteromórficas (*Colobosaura modesta*) (Pellegrino, 1998; Pellegrino e col., 1999a, b; Yonenaga-Yassuda e Rodrigues, 1999; Yonenaga-Yassuda e col., 1996, 2005).

A heterocromatina constitutiva refere-se às regiões predominantemente compostas por DNA altamente repetitivo e não codificante. De maneira geral, os microteídeos submetidos a essa técnica apresentaram pequena quantidade de heterocromatina, fracamente marcada nas regiões pericentroméricas e teloméricas dos cromossomos (Pellegrino e col., 1999a, b; Yonenaga-Yassuda e Rodrigues, 1999; Yonenaga-Yassuda e col., 2005), e o padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva constitui mais um dado que pode ser utilizado para distinguir espécies. Os cariótipos de *Vanzosaura rubricauda*, *Procellosaurinus erythrocercus* e *P. tetradactylus* são idênticos em coloração convencional ($2n= 40$, $16M+24m$), entretanto, o padrão de distribuição da heterocromatina

constitutiva é espécie-específico, sendo o cariótipo das espécies de *Procellosaurinus* constituído por grandes blocos de heterocromatina constitutiva (Yonenaga-Yassuda e col., 1996). Esta diferença cariotípica corroborou análises morfológicas que levaram à criação do novo gênero *Vanzosaura* para alocar a espécie *V. rubricauda*, que anteriormente pertencia ao gênero *Gymnophthalmus*.

A hibridação *in situ* fluorescente (FISH) é uma técnica que tem se popularizado nos últimos anos e contribui para que os mecanismos de evolução cromossômica sejam melhor compreendidos, utilizando sondas que permitem a localização de cístrons ribossomais e as sequências teloméricas, por exemplo (Porter, 1994; Porter e col. 1991, 1994; Bertolloto e col., 2001; Pellegrino e col., 1999a). Três espécies do gênero *Leposoma* foram submetidas a essa técnica utilizando a sonda telomérica e a presença de marcações intersticiais foi interpretada como resquícios de eventos de fusão/fissão centríca ocorridos durante a evolução cromossômica do gênero (Pellegrino e col., 1999a).

Embora bastante útil na detecção de possíveis rearranjos cromossômicos, como fusões Robertsonianas ou inversões pericêntricas, marcações intersticiais nem sempre refletem estes eventos. Mutação, crossing-over desigual, transposição ou amplificações endógenas também podem originar as marcações intersticiais (Wiley e col., 1992; Pagnozzi e col., 2002). Sinais na região pericentromérica, onde se observa a presença de heterocromatina constitutiva, sugerem que a sequência (TTAGGG)_n é um componente normal do DNA satélite em pelo menos alguns vertebrados (Meyne e col., 1990; Pagnozzi e col., 2002).

As técnicas de coloração convencional e diferencial além de contribuírem com a citotaxonomia, podem evidenciar sistemas de cromossomos supernumerários, mecanismos de determinação sexual do tipo simples e múltiplos (dados raros para os microteídeos, restritos a oito espécies) e espécies híbridas ou partenogenéticas.

Os relatos de ocorrência de cromossomos supernumerários em lagartos são escassos e entre os *Gymnophthalmidae* foram observados nas espécies *Nothobachia ablephara*, com até dois supernumerários (Pellegrino e col., 1999b), *Micrablepharus atticolus* e *M. maximiliani*, a primeira com um a três e a segunda com apenas um supernumerário (Yonenaga-Yassuda e Rodrigues, 1999).

Dentre os Gymnophthalmidae, dados sobre a determinação cromossômica do sexo ainda são escassos. O mecanismo cromossômico XX:XY foi descrito para cinco espécies da família: *Nothobachia ablephara* (Pellegrino e col., 1999b), *Bachia dorbignyi* (Pellegrino, 1998), *Micrablepharus atticolus*, *M. maximiliani* (Yonenaga-Yassuda e Rodrigues, 1999) e *Gymnophthalmus pleei* (Cole e col., 1990). Já em *Calyptommatus leiolepis*, *C. nicterus* e *C. sinebrachiatus* foi observado um sistema múltiplo do tipo $X_1X_1X_2X_2:X_1X_2Y$, originado a partir de translocações recíprocas entre o cromossomo sexual X com um autossomo, tratando-se do primeiro caso de sistema cromossômico sexual múltiplo descrito em Gymnophthalmidae (Yonenaga-Yassuda e col., 2005).

No gênero *Leposoma*, o estudo de Rodrigues e col. (2002) revelou uma razão sexual desigual entre machos e fêmeas na floresta atlântica da Bahia. Como nesse gênero ainda não existem evidências da presença de mecanismo de determinação cromossômica do sexo com cromossomos sexuais heteromórficos, sendo o cariótipo das fêmeas e dos machos idêntico, os autores sugerem que a maior proporção de machos nessa localidade poderia estar relacionada com alterações na temperatura de incubação, pois nas florestas da região o dossel é descontínuo em virtude das plantações de cacau.

Além destes mecanismos sexuais encontrados nos microteídeos, foram identificadas duas espécies partenogenéticas: *Gymnophthalmus underwoodi* e *Leposoma percarinatum*, esta última apresentando uma forma triploide ($3n = 66, 30M+36m$) descrita em fêmeas provenientes do estado do Mato Grosso (Pellegrino e col., 2003; Uzzell e Barry, 1971; Yonenaga-Yassuda e col., 1995).

Gymnophthalmus underwoodi apresenta um cariótipo com $2n = 44 (20M+24m)$ e exemplares de Trinidad e Suriname analisados por Cole e col. (1990) apresentaram elevado heteromorfismo cariotípico que, associado aos dados de enzimas e de DNA mitocondrial (Cole e col., 1993), sugerem uma hipótese híbrida envolvendo *G. speciosus* e *G. cryptus*. Posteriormente, em exemplares de Roraima não foi encontrada evidência de origem híbrida devido ao pareamento perfeito dos pares de homólogos após bandamento R e à divergência nucleotídica elevada entre exemplares da espécie partenogenética desta localidade e suas espécies próximas (Yonenaga-Yassuda e col., 1995; Benozzati e Rodrigues, 2003). Dessa forma, sob o nome *G. underwoodii* deve haver duas entidades distintas e dois mecanismos de partenogênese independentes.

I.3. Estudos moleculares

O advento da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR – Polymerase chain reaction) na década de 1980 e o desenvolvimento dos métodos computacionais de análise de dados biológicos impulsionaram os estudos envolvendo os dados genéticos de natureza moleculares, que fornecem uma quantidade elevada de caracteres disponíveis para análise (Matioli, 2001).

A utilização de dados moleculares, isolados ou associados a dados de outra natureza (morfológicos, por exemplo), tem contribuído para a realização de diversas revisões taxonômicas e sistemáticas e para o estabelecimento de novas hipóteses filogenéticas (Frost e col., 2001 e Schulte e col., 2003).

Entretanto, é importante ter em mente que as relações entre táxons são inferidas a partir de genealogias ou filogenias de poucos genes e que nem sempre a filogenia obtida corresponde à história evolutiva dos táxons (para uma revisão, Maddison, 1997 e Avise, 1994), sendo os eventos de hibridação, introgressão, retenção de polimorfismos ancestrais, duplicação e perda de genes, homoplasias e curto tempo de divergência entre os táxons as principais causas para ausência de correlação entre genealogias e relação entre táxons (Avise, 1989; Brower e col., 1996; Maddison, 1997; Moore, 1997; Pamilo e Nei, 1988; Slowinski e Page, 1999).

Levando-se em conta que as genealogias podem não ser representativas da história evolutiva dos grupos, duas estratégias podem ser aplicadas para lidar com as possíveis discordâncias entre árvore de genes e de espécies: (1) análises simultâneas de múltiplos *loci* independentes, embora alguns trabalhos discutam que análises concatenadas não são apropriadas para genes que passaram por histórias evolutivas muito diferentes (Slowinski e Page, 1999) e (2) utilizar genes que apresentam curtos tempos de coalescência, o que maximiza as chances de que a duração da retenção dos polimorfismos não excederá a distância entre as espécies (Hoelzer, 1997).

Escolha de genes

A escolha dos genes deve ser feita de acordo com os problemas a serem resolvidos e com o grupo em estudo. As taxas de mutação variam entre genes, entre regiões codificadoras e não

codificadoras e nas diferentes regiões de um mesmo gene. Quanto menores as restrições funcionais (regiões não-codificadoras, pseudogenes e outros), maiores as taxas evolutivas por não apresentarem um efeito deletério. A escolha de genes que apresentem variabilidade informativa é fundamental para obtenção de filogenias mais representativas da história evolutiva dos táxons estudados (Matioli, 2001).

Os genes utilizados para a reconstrução filogenética podem ser tanto do genoma mitocondrial quanto do nuclear. O genoma mitocondrial apresenta genes, em geral, de cópia única e que codificam proteínas essenciais para a manutenção de suas funções e para a expressão gênica. Apresenta também características peculiares, como herança uniparental, geralmente materna, a ausência de recombinação e de íntrons e altas taxas evolutivas comparadas com o genoma nuclear, entretanto, por seus genes serem herdados como uma unidade, não apresentam caracteres independentes para as análises, característica obtida ao se trabalhar com o genoma nuclear.

Devido à herança materna e à transmissão haplóide do DNA mitocondrial, a fixação de alelos por deriva ocorre quatro vezes mais rapidamente com relação aos nucleares, e o fluxo gênico suficiente para manter panmixia nuclear pode permitir diferenciação de linhagens mitocondriais em diferentes populações (Palumbi e col. 2001). Este fato explicaria a existência de trabalhos que encontram estruturação ou monofiletismo utilizando os genes mitocondriais que não é observada ao utilizar genes nucleares (Hare e col., 2002; Pinho e col., 2008). Por esses motivos, estudos envolvendo o genoma mitocondrial, ou fragmentos deste, teriam uma maior probabilidade de rastrear as relações de parentesco entre espécies (Brower e col., 1996; Moore, 1995).

Os genes mitocondriais mais utilizados em estudos filogenéticos em lagartos são o citocromo *b*, as subunidades da Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Desidrogenase (NADH), os RNA transportadores e os genes ribossomais 12S e 16S. Para os estudos com o genoma nuclear em lagartos, os mais utilizados são *c-mos* e o RAG-1 (Recombination activating gene 1) (Donnellan e col., 1999; Harris e col., 2001).

O citocromo *b* é uma proteína monomérica transmembrana que participa da cadeia de transporte de elétrons, e apresenta domínios conservados e variáveis. No caso dos genes ribossomais 12S e 16S, devido sua estrutura secundária, eles apresentam tanto regiões conservadas como regiões

variáveis. A NADH desidrogenase é uma grande enzima constituída de cerca de 25 cadeias polipeptídicas, sendo a sequência do gene da subunidade ND₄ a mais utilizada em lagartos, tendo aumentado também o número de trabalhos utilizando a subunidade ND₂ (McGuire e Heang, 2001; Smith e col., 2007; Ujvari e col., 2007, O'Neill e col., 2008; Doughty e col., 2010).

O *c-mos* é um proto-oncogene, de cópia única e sem íntrons que codifica uma proteína envolvida no processo de maturação dos oócitos (Yew e col., 1992), e tem sido utilizado 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 RAG-1 é essencial para a ativação da recombinação no desenvolvimento dos linfócitos e seu gene também não possui íntrons.

Trabalhos recentes utilizaram o gene “Neurotrophin-3” (NT₃) em estudos com a ordem Squamata. Este gene codifica uma importante neurotrofina no sistema nervoso central e tem funções biológicas chaves como a promoção da sobrevivência, diferenciação e plasticidade neuronal e apresenta uma evolução mais rápida do que os dois mais utilizados, *c-mos* e RAG-1 (Townsend e col., 2008).

Métodos de reconstrução filogenética

A Máxima Parcimônia (MP) supõe que a árvore mais provável é aquela que requer o menor número de passos possíveis para explicar a variação observada na matriz de dados, e baseia-se em um modelo de evolução em que uma mudança é mais provável do que duas e, sendo assim, considera que substituições independentes resultando em bases idênticas são eventos raros. (Matioli, 2001). Um problema decorrente desse método é o agrupamento incorreto de táxons que apresentam taxas de evolução heterogêneas (“atração de ramos longos”), sendo que os táxons que apresentam os maiores ramos (taxas de evolução mais altas) tendem a agrupar independente da filogenia real.

A Máxima Verossimilhança (MV) estima a probabilidade, com base em um modelo evolutivo, de um conjunto de dados estar representando um processo que realmente corresponde ao verdadeiro (Matioli, 2001). A árvore que apresentar a maior verossimilhança (probabilidade) será considerada a melhor estimativa.

A Análise Bayesiana é semelhante à análise de Máxima Verossimilhança, entretanto as probabilidades não são estimadas baseadas em um modelo *a priori*, mas após verificar como os dados se comportam (Hall, 2001). Um problema deste método de reconstrução filogenética é que, empiricamente, os valores de probabilidade posterior são consideravelmente mais elevados do que valores de bootstrap não paramétricos (Suzuki e col., 2002; Erixon e col., 2003).

Estudos moleculares em Gymnophthalmidae

Os estudos em microteídeos utilizando dados moleculares são escassos e recentes, entretanto têm contribuído bastante para a sistemática e taxonomia da família, além de auxiliar na descrição de novos gêneros e espécies. Os dados disponíveis para esses lagartos são dos genes 12S, 16S, ND₄, 18S e *c-mos*, e as diversas análises realizadas por autores distintos apresentam algumas incongruências.

Pellegrino e col. (2001) realizaram a primeira tentativa de organização da família e com base nas topologias obtidas alocaram a espécie *Anotosaura brachylepis* em um gênero novo (*Rhachisaurus*) para torná-lo monofilético. Em 2003, Doan recuperou, em suas análises, alguns gêneros merofiléticos dentro da tribo Cercosaurini e transferiu *Prionodactylus* e *Pantodactylus* para *Cercosaura*, um gênero agora constituído por seis espécies (*C. quadrilineatus*, *C. eigeinmanni*, *C. ocellata*, *C. argulus*, *C. s. albostrigata* e *C. s. schreibersi*).

Já Castoe e col. (2004) transferiram o gênero *Ptychoglossus* de Cercosaurini (como proposto por Pellegrino e col., 2001) para a subfamília Alopoglossinae, e constataram que, dentro da subfamília Gymnophthalminae, a tribo Heterodactylini é recuperada como parafilética. Além disso, apontaram *Anotosaura* como um gênero parafilético em relação a *Colobosauroides*, que *Colobosaura* é parafilético com relação a *Iphisa*, e que *Proctoporus* é um gênero polifilético com dois clados separados por *Pholidobolus*, *Cercosaura* e um clado de *Neusticurus*, também polifilético. Os autores realizaram ainda modificações no sentido de elevar as categorias taxonômicas de Eupleopodini (tribo que, na filogenia encontrada por eles, não estava relacionada a tribo Cercosaurini) para subfamília Eupleopinae, e de *Bachia*, para tribo Bachini, com posição filogenética ainda incerta, e cariótipos bastante discrepantes

com *Bachia bresslaui* apresentando $2n = 46$ (18M+28m) e *Bachia dorbignyi* $2n=32$ (18M+14m) e sistema de determinação sexual com cromossomos morfologicamente distintos do tipo XX:XY.

Ao recuperarem os gêneros *Neusticurus* e *Proctoporus* como polifiléticos em suas análises, Doan e Castoe (2005) com base em dados moleculares e morfológicos dividiram o primeiro gênero em dois e o segundo em três novos gêneros. Dessa forma, as espécies de *Neusticurus bicarinatus* e *N. rudis*, que possuem como grupo-irmão o gênero *Placosoma*, foram mantidas no gênero, enquanto as demais espécies (*N. ecpleopus*, *N. juruazensis* e *N. strangulatus*) foram alocadas no novo gênero *Potamites*. As espécies de *Proctoporus* ficaram restritas a *P. succullucu*, *P. bolivianus*, *P. guentheri* e *P. unsaaca*, as espécies *P. ventrimaculatus* e *P. cf. ventrimaculatus* foram alocadas no novo gênero *Petracola* e as espécies restantes, que tem como grupo-irmão *Pholibodolus*, *Cercosaura*, *Potamites*, foram alocados no gênero *Riama*.

A espécie *Anotosaura spn.* possui algumas características moleculares e morfológicas distintas do gênero *Anotosaura*, sugerindo se tratar de um novo gênero da radiação Ecpleopodini, sendo designada como *Dryadosaura nordestina* por Rodrigues e col. 2005. Caracteres morfológicos, tais como ausência de escamas frontoparietais, número de escamas temporais e número de costelas externas, sustentam o nó *Dryadosaura-Anotosaura* e (*Dryadosaura-Anotosaura*)-*Colobosauroides*. Dados moleculares e morfológicos combinados recuperam a topologia: (*Ecpleopus* (*Leposoma* (*Arthrosaura* (*Colobosauroides* (*Dryadosaura-Anotosaura*))))), que difere da topologia encontrada por Pellegrino e col. (2001) e Castoe e col. (2004) com relação às relações filogenéticas entre eles. Dessa forma, novos estudos ainda são necessários para o estabelecimento de uma filogenia mais congruente e robusta, seja pela adição de novos dados genéticos, associação destes com dados de outra natureza (morfológicos e cromossômicos, por exemplo) ou adição de novos terminais nas análises.

Referências Bibliográficas

- ASHLEY, T.; CACHEIRO, N.L.; RUSSELL, L.B.; WARD, D.C. 1993. Molecular characterization of a pericentric inversion in mouse chromosome 8 implicates telomeres as promoters of meiotic recombination. *Chromosoma*, 102: 112-120.
- AUFFENBERG, W. 1981. The behavioral ecology of the Komodo monitor. University of Florida, Gainesville, 406p. Morfology: 20-35.
- AVISE, J.C. 1989. Gene trees and organismal histories: a phylogenetic approach to population biology. *Evolution*, 43(6): 1192-1208.
- AVISE, J.C. 1994. Molecular markers, Natural History and Evolution. (eds. Chapman E Hall), New York, 511p.
- BAKER, R.J.; BULL, J.J.; 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.
- BENOZZATI, M.L. E RODRIGUES, M.T. 2003. Mitochondrial restriction-site characterization of Brazilian group of eyelid-less Gymnophthalmid lizards. *Journal of Herpetology*, 37(1): 161-168.
- BERTOLOTTO, C.E.V; RODRIGUES, M.T.; SKUK, G.; 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.; SKUK, G.; 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.; 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.; YONENAGA-YASSUDA, Y. 2004. Occurrence of B chromosomes in lizards: a review. *Cytogenetics and Genome Research*, 106(2-4): 243-246.
- BICKHAM, J.W. E BAKER, R.J. 1979. Canalization model of chromosomal evolution. *Bulletin. Carnegie Museum of Natural History*, 13: 70-84.
- BOUFFLER, S.; SILVER, A.; PAPWORTH, D.; COATES, J.; COX, R. 1993. Murine radiation myeloid leukaemogenesis: relationship between interstitial telomere-like sequences and chromosome 2 fragile sites. *Genes Chromosomes Cancer*, 6: 98-106.
- BOULENGER, G.A. 1885. Catalogue of the lizards in the British Museum (Natural History) I-III. London: British Museum (Natural History).

- BROWER, A.V.Z.; DESALLE, R.; VOGLER, A. 1996. Gene trees, species trees, and systematics: A cladistic perspective. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 27: 423-450.
- 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.
- CASTOE, T.A.; DOAN, T.M.; PARKINSON, C.L. 2004. Data partitions and complex models in Bayesian analysis: the phylogeny of Gymnophthalmidae lizards. *Systematic Biology*, 53(3): 448-469.
- CAVALLARO, Z. I.; BERTOLO, L. A.; PERFECTTI, F.; CAMACHO, J. P. 2000. Frequency increase and mitotic stabilization of a B chromosome in the fish *Prochilodus lineatus*. *Chromosome Research*, v. 8, n. 7, p. 627-634.
- COLE, C.J.; DESSAUER, H.C.; TOWNSEND, C.R.; ARNOLD, M.G. 1990. Unisexual lizards of the genus *Gymnophthalmus* (Reptilia, Teiidae) in the neotropics: Genetics, origin, and systematics. *Am. Mus. Novitates*, 2994: 1-29.
- COLE, C.J.; DESSAUER, H.C.; MARKEZICH, A.L. 1993. Missing link found: the second ancestor of *Gymnophthalmus underwoodi* (Squamata: Teiidae), a South American unisexual lizard of hybrid origin. *Am. Mus. Novitates*, 3055:1-13.
- COLE, C.J. E GANS, C. 1997. The karyotype of *Dibamus novaeguineae* (Squamata: Dibamidae). *Herpetologica*, 53(2): 229-232.
- DAY, J.P.; LIMOLI, C.L.; MORGAN, W.F. 1998. Recombination involving interstitial telomere repeat-like sequences promotes chromosomal instability in Chinese hamster cells. *Carcinogenesis* 19: 259-265.
- DELFIN, F.R. E FREIRE, E.M.X. 2007. Os lagartos gimnoftalmídeos (Squamata: Gymnophthalmidae) do Cariri Paraibano e do Seridó do Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil: considerações acerca da distribuição geográfica e ecológica. *Oecol. Bras.*, 11 (3): 365-382.
- DOAN, T.M. 2003. A new phylogenetic classification for the gymnophthalmid genera *Cercosaura*, *Pantodactylus* and *Prionodactylus* (Reptilia: Squamata). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 137: 101-115.
- DOAN, T.M. E CASTOE, T.A. 2005. Phylogenetic taxonomy of the Cercosaurini (Squamata: Gymnophthalmidae), with new genera for species of *Neusticurus* and *Proctoporus*. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 143: 405-416.
- DOBIGNY, G.; DUCROZ, J.F.; ROBINSON, T.J.; VOLOBOUEV, V. 2004. Cytogenetics and Cladistics. *Systematic Biology*, 53(3): 470-484.

- DONNELLAN, S.C.; MCGUIGAN, K.; KNOWLES, R.; MAHONY, M.; MORITZ, C. 1999. Genetic evidence for species boundaries in frogs of the *Litoria citropa* species group (Anura: Hylidae). *Australian Journal of Zoology*, 47: 275–293.
- DOUGHTY, P.; PEPPER, M.; KEOGH, J.S. 2010. Morphological and molecular assessment of the *Diplodactylus savagei* species complex in the Pilbara region, Western Australia, with a description of a new species. *Zootaxa* 2393: 33–45.
- ERIXON, P.; SVENNBLAD, B.; BRITTON, T.; OXELMAN, B. 2003. Reliability of Bayesian Posterior Probabilities and Bootstrap Frequencies in Phylogenetics. *Syst. Biol.* 52(5):665–673.
- ESTES, R.; QUEIROZ, K.; GAUTHIER, J. 1988. Phylogenetic relationships within Squamata. In: *Phylogenetic relationships of the lizard families* (eds E. ESTES E G. PREGILL), Stanford, California, p.119-281.
- FROST, D.R.; ETHERIDGE, R.; JANIES, D.; TITUS, T.A. 2001. Total evidence, sequence alignment, evolution of polychrotid lizards, and a reclassification of the Iguania (Squamata: Iguania). *Am. Mus. Novitates* 3343: 1-38.
- GALKINA, S.; LUKINA, N.; ZAKHAROVA, K.; RODIONOV, A.V. 2005. Interstitial (TTAGGG)_n sequences are not hot spots of recombination in the chicken lampbrush macrochromosomes 1–3. *Chromosome Research*, 13: 551–557.
- GORMAN, G.C. 1970. Chromosomes and systematics of the family Teiidae (Sauria, Reptilia). *Copeia*, 1970: 230-245.
- HALL, B.G. 2001. *Phylogenetics trees made easy. A how to manual for molecular biologists*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. 179p.
- HARE, M.P.; CIPRIANO, F.; PALUMBI, S.R. 2002. Genetic evidence on the demography of speciation in allopatric dolphin species. *Evolution*, 56(4): 804-816.
- HARRIS, D.J.; MARSHALL, J.C.; CRANDALL, K.A. 2001. Squamate relationships based on c-mos nuclear DNA sequences: increased taxon sampling improves bootstrap support. *Amphib. Reptil.* 22: 235-242.
- HEDGES, S.B. E THOMAS, R. 2001. At the lower size limit in amniote vertebrates: a new diminutive lizard from the West Indies. *Caribbean Journal of Science*, 37: 168-173.
- HOELZER, G.A. 1997. Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene tree versus nuclear-gene trees revisited. *Evolution*, 51(2): 622-626.
- HUANG C.C.; CLARK H.F.; GANS C. 1967. Karyological studies on fifteen forms of amphisbaenians (Amphisbaenia, Reptilia). *Chromosoma*, 22: 1-15.
- HUANG C.C. E GANS C. 1971. The chromosomes of 14 species of amphisbaenians (Amphisbaenia, Reptilia). *Cytogenetics*, 10: 10-22.

- HUELSENBECK, J.P., BULL, J.J.; CUNNINGHAM, C.W. 1996. Combining data in phylogenetic analysis. *Trends Ecol. Evol.*, 11: 152-158.
- KASAHARA, S.; PELLEGRINO, K.C.M.; RODRIGUES, M.T.; YONENAGA-YASSUDA, Y. 1996. Comparative Cytogenetic studies of eleven species of the *Tropidurus torquatus* group (Sauria, Tropiduridae), with banding patterns. *Hereditas*, 125(1): 1-37.
- KING, M. E ROFE, R. 1976. Karyotypic variation in the australian gekko *Phyllodactylus marmoratus* (Gray) (Gekkonidae: Reptilia). *Chromosoma*, 54: 75-87.
- KING, M. 1985. The canalization model of chromosomal evolution: a critique. *Syst. Zool.*, 34: 69-75.
- KOK, P.J.R. 2005. A new genus and species of gymnophthalmid lizard (Squamata: Gymnophthalmidae) from Kaieteur National Park, Guyana. *Bulletin de L'Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique, Biologie*, 75: 35-45.
- KOK, P.J.R. 2009. Lizard in the clouds: a new highland genus and species of Gymnophthalmidae (Reptilia: Squamata) from Maringma tepui, western Guyana. *Zootaxa*, 1992: 53-67.
- LEE, M.S.Y. 1998. Convergent evolution and character correlation in burrowing reptiles: towards a resolution of squamate relationships. *Biological Journal of the Linnean Society* 65: 369-453.
- LEE, M.S.Y. E CALDWELL, M.W. 2000. Adriosaurus and the affinities of mosasaurs, dolichosaurs, and snakes. *J. Paleont.* 74: 915-937.
- LOUW, G.N. E HOLM, E. 1972. Physiological, morphological and behavioural adaptations of the ultra-psammophilous Namib desert lizard, *Aporosaura anchietae* (Bocage). *Madoqua*, 1: 67-85.
- LOWE, C.H.; WRIGHT, J.W.; COLE, C.J.; BEZY, R.L. 1970. Chromosomes and evolution of the species groups of *Cnemidophorus* (Reptilia: Teiidae). *Syst. Zool.*, 19: 128-141.
- MACLEAN, W.P. 1974. Feeding and locomotor mechanisms of teiid lizards: functional morphology and evolution. *Papéis Avulsos de Zoologia, São Paulo*, 27: 179-213.
- MADDISON, W.P. 1997. Gene tree in species trees. *Systematic Biology*, 46(3): 523-536.
- MATIOLI, S.R. (Org). 2001. *Biologia molecular e evolução*. Ribeirão Preto, SP: Holos Editora, 202p.
- MCGUIRE, J.A. E HEANG, K.B. 2001. Phylogenetic systematics of Southeast Asian flying lizards (Iguania: Agamidae: Draco) as inferred from mitochondrial DNA sequence data. *Biological Journal of the Linnean Society*, 72: 203-229.
- 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.; MOYZIS, R.K. 1990. Distribution of non-telomeric sites of (TTAGGG)_n telomeric sequence in vertebrate chromosomes. *Chromosoma* 99: 3-10.

- MODI, W. S. E CREWS, D. 2005. Sex chromosomes and sex determination in reptiles, *Current Opinion in Genetics E Development*, v. 15, issue 6, p. 660-665.
- MOORE, W.S. 1995. Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene tree versus nuclear-gene trees. *Evolution*, 49(4): 718-726.
- MOORE, W.S. 1997. Mitochondrial-gene tree versus nuclear-gene trees, a reply to Hoelzer. *Evolution*, 51(2): 627-629.
- MYERS C.W. E DONNELLY, M.A. 2001. Herpetofauna of the Yutajé-Corocoro Massif, Venezuela: Second report from the Robert G. Goelet American Museum-Terramar Expedition to the northwestern tepuis. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 261: 1-85.
- NEAVES, W.B. 1971. Tetraploidy in a hybrid lizard of the genus *Cnemidophorus* (Teiidae). *Breviora*, 381: 1-25.
- OLMO, E.; CAPRIGLIONE, T.; ODIERNA, G. 2002. Different genomic evolutionary rates in the various reptile lineages. *Gene*, 295: 317-321.
- OLMO, E. 2005. Rate of chromosome changes and speciation in reptiles. *Genetica*, 125: 185-203.
- OLMO, E. E SIGNORINO, G. 2005. Chromorep: a reptile chromosomes database. Internet references: <http://193.206.118.100/professori/chromorep.pdf>, 10.03.11.
- O'NEILL, S.B.; CHAPPLE, D.G.; DAUGHERTY, C.H.; RITCHIE, P.A. 2008. Phylogeography of two New Zealand lizards: McCann's skink (*Oligosoma maccanni*) and the brown skink (*O. zelandicum*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48: 1168-1177.
- PACKARD, G.C E PACKARD, M.J. 1988. The physiological ecology of reptilian eggs and embryos. Pp. 523-605. In C. Gans and R. B. Huey (eds.). *Biology of the Replilia*, Vol. 16. Alan Liss, New York.
- PAGNOZZI, J.M.; DITCHFIELD, A.D.; YONENAGA-YASSUDA, Y. 2002. Mapping the distribution of the interstitial telomeric (TTAGGG)_n sequences in eight species of Brazilian marsupials (Didelphidae) by FISH and the correlation with constitutive heterochromatin. DO ITS represent evidence for fusion events in American marsupials? *Cytogenet Genome Res*, 98: 278-284.
- PALUMBI, S.R; CIPRIANO, F.; HARE, M.P. 2001. Predicting nuclear gene coalescence from mitochondrial data: the three-times rule. *Evolution*, 55(5): 859-868.
- PAMILO, P. E NEI, M. 1988. Relationships between gene tree and species trees. *Molecular Biology Evolution* 5 (5): 568-583.
- PATTON, J.L. E SHERWOOD, S.W. 1983. Chromosome evolution and speciation in rodents. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 14: 139-158.

- PEITL, P.; MELLO, S.S.; CAMPAROTO, M.L.; PASSOS, G.A.S.; HANDE, M.P.; CARDOSO, R.S.; SAKAMOTO-HOJO, E.T. 2002. Chromosomal rearrangements involving telomeric DNA sequences in Balb/3t3 cells transfected with the Ha-ras oncogene. *Mutagenesis*, 17: 67-72.
- 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). 127p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- PELLEGRINO, K.C.M.; YONENAGA-YASSUDA, Y.; RODRIGUES, M.T. 1994. Cytogenetic studies in six species of Tropiduridae (Sauria). *Rev. Brasil. Genet.*, 17: 401-408.
- PELLEGRINO, K.C.M.; RODRIGUES, M.T.; 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(1): 15-21.
- PELLEGRINO, K.C.M.; RODRIGUES, M.T.; YONENAGA-YASSUDA, Y. 1999b. Chromosomal polymorphisms due to supernumerary chromosomes and pericentric inversions in the eyelidless microteiid lizard *Nothobachia ablephara* (Squamata, Gymnophthalmidae). *Chromosome Research*, 7(4): 247-254.
- PELLEGRINO, K.C.M.; RODRIGUES, M.T.; YONENAGA-YASSUDA, Y.; SITES J.W. 2001. A molecular perspective on the evolution of microteiid lizards (Squamata, Gymnophthalmidae), and a new classification for the family. *Biological Journal of the Linnean Society*, 74: 315-338.
- PELLEGRINO, K.C.M.; RODRIGUES, M.T.; YONENAGA-YASSUDA, Y. 2003. A triploid karyotype for *Leposoma percarinatum* (Squamata, Gymnophthalmidae). *Journal of Herpetology*, 37(1): 197-199.
- PINHO, C.; HARRIS, D.J.; FERRAND, N. 2008. Non-equilibrium estimates of gene-flow inferred from nuclear genealogies suggest that Iberian and North African wall lizards (*Podarcis* spp.) are an assemblage of incipient species. *BMC Evolutionary Biology*, 8: 1-20.
- POUGH, F.H.; ANDREWS, R.M.; CADLE, J.E.; CRUMP M.L.; SAVITZKI, A.H., WELLS, K.D. 2001. Systematics and Diversity of Extant Reptiles. Pp. 101-127 in *Herpetology*.
- PORTER, C.A. 1994. Organization and chromosomal location of repetitive DNA sequences in three species of squamate reptiles. *Chromosome Research* 1994, 2: 263-273.
- PORTER, C.A.; HAMILTON, M.J.; SITES, J. W. JR.; BAKER, R.J. 1991. Location of ribosomal DNA in chromosomes of squamate reptiles: systematic and evolutionary implications. *Herpetologica*, 47: 271-280.

- PORTER, C.A.; HAIDUK, M.W.; QUEIROZ, K. 1994. Evolution and phylogenetic significance of ribosomal gene location in chromosomes of squamate reptiles. *Copeia*, 1994: 302-313.
- PRESCH, W. 1980. Evolutionary History of the South American Microteiid Lizards (Teiidae: Gymnophthalminae). *Copeia*, 1980(1): 36-56.
- PRESCH, W. 1983. The lizard family Teiidae: is it a monophyletic group? *Zoological Journal of the Linnean Society* 77: 189-197.
- RIESENBERG, L.H. 2001. Chromosomal rearrangements and speciation. *Trends in Ecology & Evolution*, 16(7): 351-358.
- RODRIGUES, M.T. 1995. Filogenia e historia geográfica de uma radiação de lagartos microteídeos (Sauria, Teiioidea, Gymnophthalmidae). Tese de Livre Docência, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- RODRIGUES, M. T. E JUNCÁ, F.A.. 2002. Herpetofauna of the Quaternary sand dunes of the middle Rio São Francisco: Bahia: Brazil. VII. *Typhlops amoipira*, sp.n., a possible relative of *Typhlops yonenagae* (Serpentes, Typhlopidae). *Papéis Avulsos Zool.*, 42(13): 325-333.
- RODRIGUES, M.T E SANTOS, E.M. 2008. A new genus and species of eyelid-less and limb reduced gymnophthalmid lizard from northeastern Brazil (Squamata, Gymnophthalmidae). *Zootaxa*, 1873: 50-60.
- RODRIGUES M.T.; ACCACIO, G.M.; DIXO M. 2002. A large sample of *Leposoma* (Squamata, Gymnophthalmidae) from the Atlantic forests of Bahia, the status of *Leposoma annectans* Ruibal, 1952, and notes on conservation. *Papéis Avulsos de Zoologia*, São Paulo, 42 (5):103-117.
- RODRIGUES, M.T.; FREIRE, E.M.X.; PELLEGRINO, K.C.M.; SITES JR., J.W. 2005. Phylogenetic relationships of a new genus and species of microteiid lizard from the Atlantic forest of northeastern Brazil (Squamata, Gymnophthalmidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 144: 543-557.
- RODRIGUES, M.T; PELLEGRINO, K.C.M.; DIXO, M.; VERDADE, V.K.; PAVAN, D.; ARGOLLO, A.J.S.; SITES JR., J.W. 2007. A new genus of microteiid lizard from the Atlantic forests of state of Bahia, Brazil, with a new generic name for *Colobosaura mentalis*, and a discussion of relationships among the Heterodactylini (Squamata, Gymnophthalmidae). *Am. Mus. Novitates*, 3565: 1-27.
- RODRIGUES, M.T; PAVAN, D.; CURCIO, F.; VERDADE, V.K.; CASSIMIRO, J.; PELLEGRINO, K.C.M. 2009. A new genus of microteiid lizard from the Caparaó mountains, southeastern Brazil, with a discussion of relationships among Gymnophthalminae (Squamata). *AM. Mus. Novitates*, 3673: 1-27.
- SAINT, K.M.; AUSTIN, C.C.; DONNELLAN, S.C.; HUTCHINSON, M.N. 1998. C-mos, a nuclear marker useful for squamate phylogenetic analysis. *Mol. Phyl. Evol.* 10: 259-263.

- SANTOS, R.M.L. 2007. Estudos evolutivos em espécies de lacertílios brasileiros da família teiidae (squamata), com base em dados citogenéticos e moleculares. 183 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- SCHMID, M.; FEICHTINGER, W.; NANDA, I.; SCHAKOWSKI, R.; GARCIA, R.V.; PUPPO, J.M.; BADILLO, A.F. 1994. An extraordinarily low diploid chromosome number in the reptile *Gonatodes taniae* (Squamata, Gekkonidae). *J. Hered.*, 85 (4): 225-260.
- SCHULTE, J.A.; VALLADARES J.P.; 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.
- SITES J.W. E MORITZ, C. 1987. Chromosomal evolution and speciation revisited. *Systematic Zoology*, 36: 153-174.
- SITES J.W, BASTEN C.J, ASMUSSEN M.A. 1996. Cytonuclear structure of a hybrid zone in the lizards of the *Sceloporus grammicus* complex (Sauria, Phrynosomatidae). *Molecular Ecology*, 5: 379-392.
- SLOWINSKI, J.B. E PAGE, R.D.M. 1999. How should species phylogenies be inferred from sequence data. *Syst. Biol.*, 48: 814–25
- SMITH, S.A.; SADLER, R.A.; BAUER, A.M.; AUSTIN, C.C.; JACKMAN, T. 2007. Molecular phylogeny of the scincid lizards of New Caledonia and adjacent areas: evidence for a single origin of the endemic skinks of Tasmantis. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43 (3): 1151-1166.
- 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.
- TOWNSEND, T.M.; LARSON, A.; LOUIS, E.; MACEY, J.R. 2004. Molecular Phylogenetics of Squamata: The Position of Snakes, Amphisbaenians, and Dibamids, and the Root of the Squamate Tree. *Systematic Biology*, 53(5): 735-757.
- TOWNSEND, T.M.; ALEGRE, R.E.; KELLEY, S.T.; WIENS, J.J.; REEDER, T.W. 2008. Rapid development of multiple nuclear loci for phylogenetic analysis using genomic resources: An example from squamate reptiles. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 47: 129-142.
- UJVARI, B.; DOWTON, M.; MADSEN, T. 2007. Mitochondrial DNA recombination in a free-ranging Australian lizard. *Biol. Lett*, 3; 189–192.
- UZZELL, T. E BARRY, J.C. 1971. *Leposoma percarinatum*, a unisexual species related to *L. guianense*; and *Leposoma ioanna*, a new species from Pacific coastal Colômbia (Sauria, Teiidae), *Postilla*, Peabody Museum, 154: 1-39.
- VENTURA, K.; O BRIEN, P.C.M.; YONENAGA-YASSUDA, Y.; FERGUSON-SMITH, M.A. 2009. Chromosome homologies of the highly rearranged karyotypes of four Akodon species (Rodentia,

- Cricetidae) resolved by reciprocal chromosome painting: the evolution of the lowest diploid number in rodents. *Chromosome Research*, 17: 1063-1078.
- VIDAL, N. E HEDGES, S.B., 2005. The phylogeny of squamate reptiles (lizards, snakes and amphisbaenians) inferred from nine nuclear protein-coding genes. *C R Biologies*, 328, 1000–1008.
- VIDAL, N. E HEDGES, S.B. 2009. The molecular evolutionary tree of lizards, snakes, and amphisbaenians. *C R Biologies*, 332: 129-139.
- VITT, L.J., PIANKA, E.R., COOPER JR., W.E., SCHWENK, K., 2003. History and the global ecology of squamata reptiles. *Am. Nat.* 162, 44–60.
- WHITING, A.S.; BAUER, A.M.; 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.
- WILEY, J.E.; MEYNE, J.; LITTLE, M.L.; STOUT, J.C. 1992. Interstitial hybridization sites of the (TTAGGG)_n telomeric sequence on the chromosomes of some North American hyliid frogs. *Cytogenetic Cell Genetics* 61: 55-57.
- YEW, N.; MELLINI, M.L.; MARTINEZ, C.K.; WOUDE, G.F.V. 1992. Meiotic initiation by mos protein in *Xenopus*. *Nature*, 355: 649-652.
- YONENAGA-YASSUDA, Y.; KASAHARA, S.; CHU, T.H.; RODRIGUES, M.T. 1988. High resolution RBG - banding patterns in the genus *Tropidurus* (Sauria, Iguanidae). *Cytogenet. Cell Genet.*, 48: 68-71.
- YONENAGA-YASSUDA, Y. E RODRIGUES, M.T. 1999. Supernumerary chromosome variation, heteromorphic sex chromosomes and banding patterns in microteiid lizards of the genus *Micrablepharus* (Squamata, Gymnophthalmidae). *Chromosome Research*, 7(1): 21-29.
- YONENAGA-YASSUDA, Y.; VANZOLINI, P.E.; RODRIGUES, M.T.; CARVALHO, C.M. 1995. Chromosome banding patterns in the unisexual microteiid *Gymnophthalmus underwoodi* in two related sibling species (Gymnophthalmidae, Sauria). *Cytogenet. Cell Genet.*, 70: 29-34.
- YONENAGA-YASSUDA, Y.; MORI, L.; CHU, T.H.; 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.; RODRIGUES, M.T.; PELLEGRINO, K.C.M. 2005. Chromosomal banding patterns in the eyelid-less microteiid radiation: the X₁X₂Y:X₁X₁X₂X₂ sex chromosome system in *Calyptommatus*, and the karyotypes of *Psilophthalmus* and *Tretioscincus* (Squamata, Gymnophthalmidae). *Genetics and Molecular Biology*, 28(4): 700-709.

Objetivos

Tendo em vista a elevada diversidade cariotípica na família Gymnophthalmidae, a riqueza de gêneros e espécies, das quais grande parte permanece sem caracterização cromossômica, evidências de que sua biodiversidade permanece ainda subestimada quando levamos em consideração a descrição de nove gêneros e diversas espécies desde 2000, além da controversa relação entre e dentro das tribos, os objetivos deste trabalho foram caracterizar citogeneticamente algumas espécies da família Gymnophthalmidae e conduzir estudos moleculares em representantes da tribo Ecleopodini (*sensu* Pellegrino e col., 2001; Rodrigues e col., 2005 e 2007) na tentativa de aprimorar as relações filogenéticas entre os gêneros deste grupo, contribuindo para o entendimento de sua história evolutiva.

Como objetivos específicos pretende-se:

- Descrever citogeneticamente exemplares da espécie partenogenética *Leposoma percarinatum* e de uma espécie bissexual relacionada, *Leposoma ferreirai*, simpátricas do Arquipélago de Anavilhanas, no estado do Amazonas (Cap. 1);
- Descrever citogeneticamente espécies pertencentes à tribo Ecleopodini e comparar as novas informações com dados já existentes na literatura para outras espécies da tribo (Cap. 2);
- Ampliar o conjunto de dados moleculares já disponíveis para os representantes dos Ecleopodini com a inclusão de novas regiões gênicas, duas mitocondriais (citocromo *b* e ND₂) e uma nuclear (NT₃), expandir os dados para outras espécies e, dessa forma, contribuir para o entendimento das relações filogenéticas dos gêneros deste grupo, assim como fornecer novas informações que possam auxiliar futuros estudos taxonômicos e sistemáticos nesses lagartos (Cap. 3);
- Descrever citogeneticamente espécies pertencentes à tribo Heterodactylini e comparar as novas informações com dados já existentes na literatura para outras espécies da tribo (Cap. 4);
- Caracterizar citogeneticamente *Scriptosaura catimbau*, novo gênero e espécie de microteídeo (Gymnophthalmidae, Squamata) e investigar seu posicionamento na tribo Gymnophthalmini (Cap. 5).

Material e Métodos Geral

III. 1. Animais analisados

III.1.1. Animais analisados citogeneticamente

Foram analisados citogeneticamente 72 exemplares da família Gymnophthalmidae, representantes das tribos: Ecpleopodini, Gymnophthalmini e Heterodactylini (*sensu* Pellegrino e col., 2001; Rodrigues e col., 2005, 2007) (Tabela 1). Os exemplares foram coletados em diversas localidades durante viagens de campo e de levantamento faunístico realizadas pelo grupo do Professor Dr. Miguel Trefaut Rodrigues, do Departamento de Zoologia do IBUSP, coordenador do projeto temático da FAPESP (Sistemática e evolução da herpetofauna neotropical - Proc. 03/10335-8R) ao qual o presente trabalho está vinculado.

Tabela 1 - Relação de espécies, tribo a qual pertencem, números de tombo do Laboratório de Citogenética de Vertebrados (LG) ou de campo (demais números), sexo e localidade dos exemplares analisados citogeneticamente.

Espécie	Tribo	Exemplar	Sexo	Localidade
<i>Arthrosaura kockii</i>	Ecpleopodini	LG 1283	M	Vila Rica – MT
		LG 1603	M	
		LG 1604	F	
		LG 1605	M	
		LG 1606	F	
		977932	M	
<i>Arthrosaura reticulata</i>	Ecpleopodini	968291	M	Juruena – MT
		976977*	M	
		977670*	F	
		LG 1495	?	
<i>Colobosauroides carvalhoi</i>	Ecpleopodini	LG 2122	M	Ibiapara - CE
		LG 2126	M	
		LG 2127*	M	
		LG 2128	M	
		LG 2129*	M	
<i>Dryadosaura nordestina</i>	Ecpleopodini	STS186*	M	Mamanguape – PB
<i>Leposoma annectans</i>	Ecpleopodini	MD1159	M	Una - BA
<i>Leposoma ferreirai</i>	Ecpleopodini	MTR9942	M	Ilha do Açaí, E.E. Anavilhanas - AM
		MTR9943	F	
		MTR9944	F	
		MTR9945	F	
		MTR9948*	F	
		MTR9949	M	
		MTR9950	F	
		MTR9951	F	
		MTR9952*	F	
		MTR9953	F	
		MTR9954	M	

<i>Leposoma nanodactylus</i>	Ecpleopodini	LG 1778	M	Serra do Teimoso – BA
<i>Leposoma percarinatum</i>	Ecpleopodini	MTR9939*	F	Estação Ecológica de Anavilhanas - AM
		MTR9940*	F	
		MTR9941	F	
		MTR9954	F	
<i>Calypotommatus leiolepis</i>	Gymnophthalmmini	LG 602	M	Queimadas – BA
<i>Nothobachia ablephara</i>	Gymnophthalmmini	LG 468	F	Alagoado - BA
<i>Scriptosaura catimbau</i>	Gymnophthalmmini	MTR14102*	F	Parque Nacional do Catimbau, Buique - PE
		MTR14103	M	
		MTR14104	M	
		MTR14107	F	
		MTR14108	F	
		MTR14109	M	
		MTR14110	F	
		MTR14111	F	
		MTR14112	F	
		MTR14113	M	
		MTR14114	F	
		MTR14115	F	
		MTR14116*	F	
<i>Acratosaura mentalis</i>	Heterodactylini	JC1505	M	Guinda, Diamantina – MG
		JC1504	F	Grão Mogol – MG
		MTJ0341	F	Parque Nacional Cavernas do Peruaçu – MG
		MTR15434	?	
		MTR15435	?	
		MTR17265	M	Jequitinhonha – MG
		MTR17419	M	
		MTR17430	F	
<i>Alexandresaurus camacan</i>	Heterodactylini	MTR13642	F	Trancoso - BA
<i>Caparaonia itaquara</i>	Heterodactylini	MTR11620	M	Parque Nacional do Caparaó - MG
		LG 2174	F	
		LG 2175	F	
		LG 2176	F	
<i>Colobodactylus taunayi</i>	Heterodactylini	IT-H0507	F	Buri – SP
		H0367	F	Ribeirão Grande – SP
		LG 1397	?	
		LG 1236	F	Cananéia - SP
		IT-H0556	M	
		LG 1121	M	
		LG 1673	M	Serra da Cantareira – SP
		LG 2108	M	Wenceslau-Brás – PR
<i>Heterodactylus lindii</i>	Heterodactylini	JC1500	F	Parque Nacional da Serra do Cipó - MG
<i>Heterodactylus imbricatus</i>	Heterodactylini	Uniban197	M	Serra da Cantareira – SP
		LG 2109	F	Poços de Caldas - MG

(*) Exemplares utilizados para as análises moleculares.

III.1.2. Animais analisados molecularmente

O DNA total de 25 exemplares das tribos Ecpleopodini (19 exemplares, 11 espécies), Cercosaurini (três exemplares, duas espécies), Gymnophthalmini (dois exemplares, uma espécie) e da subfamília Alopoglossinae (um exemplar, uma espécie) foi utilizado para as análises moleculares, sendo extraído segundo protocolo de Aljanabi e Martinez (1997), a partir de amostras de fígado, músculo ou cauda. Foram adicionadas às análises sequências de *Leposoma scincoides* (provenientes do GenBank) e de *Kaieuteosaurus hindsii* (obtidas pelo grupo do Prof. Miguel Trefaut Rodrigues) que, de acordo com análises preliminares, é um membro da tribo Ecpleopodini, cujo posicionamento é incerto.

Foram empregados nas análises dois indivíduos por espécie da mesma localidade (quando possível) para tentar garantir que todas as espécies apresentariam todos os genes sequenciados.

A relação das espécies, tribo/subfamília ao qual pertencem, localidades, número dos exemplares e código utilizado nas análises encontram-se na Tabela 2 e os exemplares que tiveram sequências retiradas do GenBank encontram-se na Tabela 3.

Tabela 2 - Relação das espécies, tribo/subfamília ao qual pertencem, localidade, genes amplificados (as condições de amplificação - A a K - relacionadas na Tabela 5 encontram-se entre parênteses), número dos exemplares (LG ou campo), utilizados nas análises moleculares da tribo Ecleopodini. O símbolo “GB” se refere às sequências retiradas do GenBank (Tabela 3) e “*” às sequências doadas.

Tribo/ Subfamília	Espécie	Localidade	Número do exemplar	DNA mitocondrial				DNA Nuclear	
				16S	cit <i>b</i>	ND ₂	ND ₄	<i>c-mos</i>	NT ₃
Ecleopodini	<i>Anotosaura vanzolinia</i>	Cabaceiras – PB	926043	X (A)	X (G)	X (A)	X (A)	-	X (A)
			907989	X (A)	X (G)	X (A)	X (B)	X (G)	X (B)
	<i>Arthrosaura kockii</i>	Vila Rica – MT	978011	X (A)	X (G)	X (A)	X (D)	-	X (B)
			977924	X (A)	X (F)	X (A)	X (B)	-	X (B)
	<i>Arthrosaura reticulata</i>	Juruena – MT	976977	X (A)	X (G)	X (A)	X (K)	GB	X (D)
		Aripuanã - MT	977670	X (D)	-	X (D)	X (D)	X(G)	X (G)
	<i>Colobosauroides carvalhoi</i>	Ibiapaba – CE	LG 2129	X (A)	X (K)	X (A)	-	X (G)	X (C)
			LG 2127	X (A)	-	X (A)	X (B)	X (G)	X (B)
	<i>Colobosauroides cearensis</i>	Pacoti – CE	LG 1348	X (A)	X (H)	X (A)	X (B)	X (K)	X (B)
			LG 1353	-	X (K)	X (A)	-	-	X (B)
	<i>Dryadosaura nordestina</i>	Mamanguape – PB	LG 1479	X (B)	X (K)	X (A)	X (B)	X (G)	X (B)
	<i>Ecleopus gaudichaudii</i>	Juquitiba – SP	LG 2087	X (I)	X (G)	X (D)	X (B)	X (G)	X (D)
			LG 2092	X (D)	X (G)	X (D)	-	X (G)	X (D)
	<i>Kaieterosaurus hindsii</i>	Guiana	MTR 09984	X (*)	-	-	X (*)	X (*)	-
	<i>Leposoma ferreirai</i>	Ilha do Açaí, E.E.	LG 2338	X (I)	-	X (A)	X (B)	X(*)	X (C)
		Anavilhanas – AM	LG 2342	X (A)	-	X (D)	X (B)	-	X (D)
	<i>Leposoma percarinatum</i> diplóide	E.E. Anavilhanas – AM	LG 2331	X (A)	-	X (C)	-	X (*)	X (B)
			LG 2332	X (A)	-	X (A)	X (B)	X (*)	X (D)
	<i>Leposoma percarinatum</i> triplóide	Vila Rica – MT	LG 1288	X (I)	X (G)	X (C)	-	-	X (G)
			LG 1287	X (A)	X (G)	X (A)	X (B)	-	X (B)
	<i>Leposoma scincoides</i>	Una - BA	LG 1409	GB	GB	-	-	GB	-
Grupos externos									
Alopoglossinae	<i>Alopoglossus angulatus</i>	Guajará-Mirim – RO	LG 1026	X (A)	-	X (D)	-	-	X (D)
Cercosaurini	<i>Placosoma glabellum</i>	Iguape – SP	LG 940	X (A)	-	X (D)	X (B)	X (G)	X (E)
	<i>Cercosaura ocellata</i>	Aripuanã – MT	977406	X (D)	-	X (D)	GB	GB	-
			977762	X (D)	X (G)	X (D)	-	X (G)	-
Gymnophthalmini	<i>Scriptosaura catimbau</i>	Buique – PE	LG 2415	X (A)	X (J)	X (A)	-	X (I)	X (G)
			LG 2426	X (A)	X (J)	X (A)	X (B)	-	X (B)

Tabela 3: Relação das espécies, localidade, número dos exemplares e número de identificação do GenBank utilizados nas análises moleculares das tribos Gymnophthalmini e Ecpleopodini.

Tribo	Espécie	Localidade	Número do exemplar	GenBank 16S	GenBank cit <i>b</i>	GenBank ND₄	GenBank c-<i>mos</i>
Gymnophthalmini	<i>Calyptommatus leiolepis</i>	Queimadas – BA	MTR 05055	AF 420712	-	AF 420874	AF 420858
	<i>Calyptommatus nicterus</i>	Vacaria – BA	MTR 05054	AF 420747	-	AF 420903	AF 420822
	<i>Nothobachia ablephara</i>	Petrolina - PE	LG 897	AF 420740	-	AF 420900	AF 420851
	<i>Procellosaurinus erythocercus</i>	Queimadas - BA	MTR 05057	AF 420711	-	AF 420870	AF 420836
	<i>Procellosaurinus tetradactylus</i>	Alagoado – BA	MTR 05056	AF 420713	-	AF 420871	AF 420818
	<i>Psilophthalmus paeminus</i>	Santo Inácio - BA	MTR 05058	AF 420710	-	AF 420872	AF 420825
	<i>Gymnophthalmus leucomystax</i>	Fazenda Salvamento - RR	MTR 946613	AF 420715	-	AF 420906	AF 420824
	<i>Gymnophthalmus vanzoi</i>	Fazenda Salvamento - RR	MTR 946639	AF 420743	-	AF 420867	AF 420827
	<i>Vanzosaura rubricauda</i>	Vacaria – BA	MTR05059	AF 420716	-	EU 620442	AF 420839
	<i>Micrablepharus atticolus</i>	Santa Rita do Araguaia - GO	LG 854	AF 420718	-	AF 420904	AF 420826
	<i>Micrablepharus maximiliani</i>	Barra do Garça – MT	LG 1017	AF 420730	-	AF 420875	AF 420850
	<i>Tretioscincus agilis</i>	Vila Rica - MT	MTR 978177	AF 420732	-	AF 420891	AF 420837
	<i>Tretioscincus oriximinensis</i>	Poção - PA	MTR 926415	AF 420752	-	AF 420888	AF 420846
Ecpleopodini	<i>Leposoma scincoides</i>	Una - BA	LG 1409	AY217954	AY217800	-	AY217851
	<i>Cercosaura ocellata</i>	Aripuanã - MT	MTR 977406	-	-	AF420883	AF420834.1
	<i>Arthrosaura reticulata</i>	Juruena - MT	MTR 976977	-	-	-	AF420841.1

III.2. Procedimentos metodológicos

III.2.1. Preparações cromossômicas

Para a preparação direta dos lagartos em laboratório, foi injetada intraperitonealmente no animal uma solução de fitohemaglutinina-M (Gibco) (5 ml de fitohemaglutinina diluída em 37,5 ml de água destilada - técnica adaptada de Baker e col., 1971), na proporção de 0,1 ml/10 g de peso do animal, 24 a 48 horas antes do sacrifício, para estimular a divisão celular e a resposta imune. Cerca de quatro horas antes do sacrifício foi injetada intraperitonealmente uma solução de colchicina 0,1 % na proporção de 0,1 ml/10 g de peso do animal. Após a injeção destas drogas, o animal foi mantido à temperatura aproximada de 30° C. Para a preparação dos lagartos em campo, a solução de fitohemaglutinina não foi utilizada.

As melhores metáfases, nas diferentes técnicas de coloração, foram fotografadas em microscópio da marca Zeiss em objetiva 100x de imersão com filtro verde, usando filme Kodak Imagelink HQ ASA 64. As fotos foram ampliadas em nosso laboratório em papel Kodabrome Print RC F-3 (Kodak), reveladas com Dektol diluído em água (na proporção de 1:4) e fixadas em Dektol puro, sendo recortadas e escaneadas após a montagem dos cariótipos. Além disso, as metáfases também foram registradas utilizando o sistema de captura de imagens Ikaros & Isis, v 5.0, Metasystems 2004, sendo os cariótipos posteriormente montados no programa Photoshop CS3.

A análise das lâminas de hibridação *in situ* fluorescente utilizando a sonda telomérica (TTAGGG)_n foi realizada em fotomicroscópio de fluorescência, com o auxílio dos filtro para DAPI e Cy3 ou Rhodamina para visualizar os sinais de hibridação.

Os cariótipos foram montados levando-se em conta a morfologia, o tamanho e a posição centromérica dos cromossomos, sendo dispostos em ordem decrescente de tamanho.

Preparação de medula óssea, segundo Ford e Hamerton (1956), com modificações

1. 1. Sacrificar o animal com éter, já previamente submetido ao tratamento com fitohemaglutinina (quando possível) e colchicina. Retirar o fêmur e cortar as epífises;

2. Lavar sucessivas vezes o canal ósseo em uma placa de petri utilizando uma seringa com 3 a 5 ml de solução de Hanks, homogeneizando a solução, desprezando os resíduos teciduais.
3. Transferir para um tubo de centrifuga e centrifugar 10 minutos a 1200 rpm. Desprezar o sobrenadante;
4. Adicionar de 5 a 7 ml de solução hipotônica (KCl 0,075 M), ressuspender suavemente o material e incubar a 37°C por 20 minutos;
5. Retirar da estufa ou banho-maria e adicionar 6 gotas de fixador gelado recém-preparado (3metanol: 1 ácido acético), homogeneizando levemente a suspensão. Esperar 10 minutos e adicionar 3 ml de fixador. Ressuspender levemente e deixar 10 minutos em temperatura ambiente;
6. Centrifugar a 1.200 rpm durante 10 minutos e desprezar o sobrenadante;
7. Colocar de 5 a 7 ml de fixador, pipetar repetidas vezes, centrifugar novamente e desprezar o sobrenadante;
8. Ressuspender o material em fixador por 2 ou 3 vezes, dependendo da quantidade de material;
9. Após a última centrifugação, desprezar o sobrenadante e adicionar fixador na proporção de 2:1 em relação à quantidade de sedimento. Homogeneizar levemente a suspensão;
10. Pingar uma a duas gotas da suspensão celular em lâminas segundo Henegariu e col., 2001.

Preparação direta de baço, fígado e pulmões, segundo Yonenaga (1972), com modificações

1. Sacrificar o animal com éter, já previamente submetido ao tratamento com fitohemaglutinina e colchicina. Retirar o baço, o fígado e o pulmão do animal e colocá-los em uma placa de Petri pequena contendo cerca de 5 ml de solução de Hanks;
2. Injetar repetidas vezes essa solução com o auxílio de uma seringa, até que os órgãos fiquem transparentes, homogeneizando a solução, desprezando os resíduos teciduais;
3. Repetir os passos de 3 a 10 da preparação de medula óssea de Hamerton e Ford (1956).

Preparação direta de testículos, segundo Eicher (1966), com modificações

1. 1. Sacrificar o animal com éter, já previamente submetido ao tratamento com fitohemaglutinina e colchicina. Retirar os testículos e colocá-los em uma placa de Petri contendo cerca de 3ml de solução de Hanks;
2. Separar os túbulos seminíferos com auxílio de estiletes e, com estes, romper os túbulos a fim de homogeneizar o material;
3. Os procedimentos seguintes são os descritos nos itens 3 a 10 da técnica de preparação de medula óssea de Ford e Hamerton (1956).

Suspensão de células de intestino, segundo Schmid (1978)

1. Retirar o intestino, colocá-lo em placa de Petri proceder a hipotonização por 30 minutos em água destilada à temperatura ambiente;
2. Retirar a água destilada e adicionar fixador etanol-ácido acético (3:1) recém-preparado. Manter em fixador pelo menos um dia;
3. Retirar o fixador etanol-ácido acético (3:1) e adicionar ácido acético 50%, por 10 minutos em temperatura ambiente;
4. Descartar o ácido acético 50%, abrir o intestino em sua extensão, adicionar fixador metanol-ácido acético (3:1) e raspar o epitélio interno;
5. Transferir a solução para um tubo de centrifuga e completar o volume para 7 ml e pipetar repetidas vezes. Centrifugar a 1.200 rpm durante 10 minutos e desprezar o sobrenadante;
6. Os passos seguintes estão descritos nos itens 3 a 10 da técnica de preparação de medula óssea de Ford e Hamerton (1956).

Preparação da lâmina, segundo Henegariu e col. (2001)

1. Pingar uma ou duas gotas de fixador metanol-ácido acético 3:1 em uma lâmina armazenada em álcool e recém seca;

2. Pingar uma gota da suspensão celular (após a adição de fixador na proporção 2:1 em relação à quantidade de sedimento);

3. Virar a superfície da lâmina contendo o material para baixo e a colocar em contato com o vapor de água do banho-maria a 60°C durante alguns segundos, e em seguida, colocar a lâmina em uma estufa a 65° C sobre uma superfície quente até a lâmina secar.

III.2.2. Coloração e bandamento cromossômico

Coloração convencional

1. Hidrolisar a lâmina em HCl 1 N a 60° C por 7 minutos. Lavar em água destilada;
2. Corar com solução de Giemsa (Merck) diluído em tampão fosfato pH 6,8 na proporção de 1:30, por cerca de 7 minutos. Lavar em água destilada e secar.

Coloração das Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs), segundo Howell e Black (1980)

1. Hidrolisar as lâminas em HCl 1 N a 60° C por 7 minutos. Lavar em água destilada;
2. Pingar uma gota de solução coloidal reveladora (1 g de gelatina para microbiologia da Merck em 2 ml de água destilada com 0,5 ml de ácido fórmico) e duas gotas de solução de nitrato de prata (AgNO_3) 50 % sobre o material da lâmina;
3. Cobrir com lamínula e incubar por 2 a 5 minutos em câmara úmida a 60° C;
4. Retirar a lamínula, lavar em água destilada e corar com solução de Giemsa diluído em tampão fosfato pH 6,8 (1:30) durante 20 segundos. Lavar em água destilada e secar.

Bandamento C (CBG), segundo Sumner (1972), com modificações

1. Hidrolisar a lâmina em HCl 0,02 N durante 30 minutos, em temperatura ambiente. Lavar em água destilada e deixá-la secar;
2. Mergulhar a lâmina em solução de hidróxido de bário octahidratado 5 % ($\text{Ba}(\text{OH})_2$) previamente aquecida em banho-maria a 37° C, de 3 a 5 minutos;

3. Passar a lâmina rapidamente em HCl 1 N a 60° C e em seguida, lavar a lâmina com água destilada até eliminar totalmente a solução de bário;
4. Incubar em 2xSSC pH 7,0 a 60° C durante 30 minutos. Lavar em água destilada;
5. Corar com solução de Giemsa (Merck) diluído em tampão fosfato pH 6,8 (1:20) durante 30 minutos. Lavar em água destilada e secar.

Hibridação in situ fluorescente (FISH) com sonda telomérica (TTAGGG)_n, com protocolo do “Telomere PNA FISH Kit/FITC (DAKO)”

Pré-tratamento

1. Mergulhar as lâminas em solução de TBS 1 por dois minutos;
2. Passar as lâminas para solução de formaldeído 3,7% por dois minutos;
3. Incubar em TBS 1 por 5 minutos;
4. Incubar em TBS 2 por 5 minutos;
5. Passar as lâminas para a solução de pré-tratamento e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente;
6. Incubar em TBS 3 por 5 minutos;
7. Incubar em TBS 4 por 5 minutos;
8. Passar as lâminas por uma série de etanol gelado 70%, 85% e 96%, durante 2 minutos em cada;
9. Deixar as lâminas secarem em posição vertical por cerca de 5 minutos.

Denaturação e hibridação

1. Adicionar 10 µl da sonda telomérica proveniente do Kit PNA/FITC na área da lâmina previamente delimitada;
2. Cobrir com lamínula de 18 x 18 mm;
3. Colocar as lâminas em uma estufa a 80° C por 3 minutos;
4. Transferir as lâminas para uma câmara escura, a temperatura ambiente. Aguardar o processo de hibridação ocorrer por 30 minutos.

Lavagens

1. Incubar as lâminas em solução de “Rinse” para lavagem e retirada das lamínulas, por aproximadamente 1 minuto;
2. Incubar as lâminas na solução de lavagem por 5 minutos a 65° C;
3. Passar as lâminas por uma série de etanol gelado 70%, 85% e 96%, durante 2 minutos cada;
4. Deixar as lâminas secarem em posição vertical por cerca de 5 minutos.

Montagem da lâmina

1. Aplicar 20 µl de solução de DAPI e Vectashield (0,1µl/ml) e cobrir com lamínula (24 x 50 mm);
2. Deixar as lâminas descansarem por 15 minutos no escuro antes de proceder à análise.

III.2.3. Procedimentos de Genética Molecular

Extração de DNA, segundo Aljanabi e Martinez, 1997

O DNA genômico total foi extraído de amostras de fígado, músculo da coxa ou cauda conservadas em ultrafreezer a -80°C ou etanol absoluto;

1. Retirar uma amostra de tecido, colocar em tubo *ependorf* de 1,5 ml estéril e deixar secar em estufa a 37° C até que todo o álcool tenha evaporado;
2. Homogeneizar a amostra com auxílio de uma tesoura, pinça ou pistilo em 400µl de tampão salino;
3. Adicionar 40 µl de SDS 20% (concentração final de 2%) e de 5 a 8 µl de proteinase K. Misturar bem;
4. Incubar por no mínimo 1 hora a 65° C.
5. Retirar da estufa e esperar a amostra atingir a temperatura ambiente. Adicionar 10 µl de RNase e deixar 1 hora a 37° C;
6. Adicionar 300 µl de NaCl 6M e vortexar em alta velocidade por aproximadamente 1 minuto;
7. Centrifugar a 10.000G por 30 minutos;

8. Transferir o sobrenadante para tubo de centrífuga de 1,5ml estéril;
9. Adicionar 600 µl de isopropanol e misturar bem vertendo o tubo delicadamente;
10. Incubar a -20° C por pelo menos 1 hora (podendo ser deixado *overnight*);
11. Centrifugar 20 minutos a 10.000G à 4° C;
12. Descartar o sobrenadante e lavar o pellet em 600 µl de etanol 70%, e centrifugar 10 minutos a 10.000G à 4° C;
13. Descartar o sobrenadante e secar o pellet em estufa ou deixar a temperatura ambiente *overnight*;
14. Adicionar 50 µl de TE ou água estéril e manter as amostras 24 horas a 4 ° C. Armazenar em freezer.

Soluções utilizadas

TE

5 ml de Tris-HCl 1M, pH 8,0;
1 ml de EDTA 0,5M, pH 8,0;
Completar para 50 ml com água
destilada.

Tampão salino

6,66ml de NaCl 6M;
1 ml de Tris-HCl 1M, pH 8,0;
0,4ml de EDTA 0,5M, pH 8,0;
Completar para 100 ml com água destilada.

III.2.4. Obtenção das sequências

Amplificação dos genes (PCR)

Após a extração, amostras de DNA total aplicadas em um gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e foram submetidas à eletroforese para verificação da qualidade da extração. A concentração do DNA dos 25 exemplares foi quantificada em espectrofotômetro (Ultrospec 1000, Pharmacia Biotech) e para cada amostra foi preparada uma solução de uso com concentração final igual a 20ng/µl, diluída em TE.

Os genes utilizados nas reconstruções filogenéticas foram o *c-mos* e NT₃ (nucleares) e 16S, citocromo *b*, ND₂ e ND₄ (mitocondriais) e os *primers* utilizados encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4: Descrição dos *primers* utilizados para cada um dos genes e tamanho do segmento amplificado.

Gene	Primer	Segmento (pares de bases)
16S	F (5'- CGC CTG TTT AAC AAA AAC AT- 3') R (5'- CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T- 3')	600
citocromo <i>b</i>	CB1 (5' - CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA - 3') CBH3 (5' - GGC AAA TAG CAA RTA TCA TCC - 3')	750
ND ₂	Met-L4437 (5'-AAG CTT TCG GGC CAT ACC-3') ND ₂ -H4980 (5'-GTT AGT GGT CAG GGC TTG GRT C- 3')	550
ND ₄	ND ₄ F (5'- CAC CTA TGA CTA CCA AAA GCT CAT GTA GAA GC- 3') Leu (5'- CAT TAC TTT TAC TTG GAT TTG CAC CA- 3')	750
<i>c-mos</i>	G73 (5'- GCG GTA AAG CAG GTG AAG AAA- 3') G74 (5'- TGA GCA TCC AAA GTC TCC AAT C- 3')	500
NT ₃	F1 (5'-ATG TCC ATC TTG TTT TAT GTG ATA TTT-3') R1 (5'-ACR AGT TTR TTG TTY TCT GAA GTC-3')	750

Cada reação de PCR apresentou um volume final de 25 µL (quantidades e concentrações – Tabela 3), sendo realizadas em termociclador PTC-110 Programmable Thermal Controller - MJ Research, utilizando o ciclo básico de 4 minutos a 94°C; 10 ciclos: 30 segundos a 92°C, 30 segundos a 46-53°C, 1 minuto e meio a 72°C; 40 vezes: 30 segundos a 92°C, 30 segundos a 48-56°C, 1 minuto e meio a 72°C; seguidos por uma elongação final 10 minutos a 72°C e um período de resfriamento a 4°C, havendo variação na temperatura de anelamento de acordo com o gene e espécie em estudo.

As reações de PCR de cada gene apresentaram variações nas concentrações de MgCl₂, DNA, dNTP e utilização dos tampões de KCl e NH₄SO₂ separados e misturados, além de variação na temperatura de anelamento. As condições de amplificação de cada gene encontram-se listadas na Tabela 5.

Para verificação da amplificação e da qualidade dos produtos de PCR, estes foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% (tampão TAE 1x) corado com brometo de etídio e visualizados em transluminador de luz ultravioleta. Os géis foram fotografados e digitalizados pelo programa da Kodak (Electrophoresis Documentation and Analysis System).

Tabela 5. Relação das condições utilizadas para as reações de PCR que constam na Tabela 2.

Condições	Volume de reagentes da PCR (µl)								Temperatura anelamento	
	H2O	dNTP (2,0mM)	Primers (10mM)	Tampão KCl	Tampão NH4SO2	MgCl2 (25mM)	DNA (20ng/µl)	Taq (2,5U)	T1 (°C)	T2 (°C)
(A)	15,25	2,5	1,0	2,5	0	1,5	1,0	0,25	46	48,5
(B)	13,75	2,5	1,0	2,5	0	2,0	2,0	0,25	46	48,5
(C)	12,5	3,0	1,0	2,5	0	2,0	2,5	0,25	46	48,5
(D)	15,25	2,5	1,0	2,5	0	1,5	1,0	0,25	48	50,5
(E)	15,25	2,5	1,0	2,5	0	1,5	1,0	0,25	50	53
(F)	15,25	2,5	1,0	2,5	0	1,5	1,0	0,25	53	56
(G)	15,25	2,5	1,0	1,25	1,25	1,5	1,0	0,25	50	53
(H)	15,25	2,5	1,0	1,25	1,25	1,5	1,0	0,25	52	54,5
(I)	15,25	2,5	1,0	2,5	0	1,5	1,0	0,25	52	54,5
(J)	15,25	2,5	1,0	2,5	0	1,5	1,0	0,25	48,5	51
(K)	14,5	2,5	1,0	1,25	1,25	1,75	1,5	0,25	48,5	51

(T1) temperatura nos 10 primeiros ciclos, (T2) – temperatura nos últimos 40 ciclos

Purificação do produto de PCR e Reação de Sequenciamento

Os produtos de PCR foram purificados utilizando as enzimas Exonuclease I (Exo I, 10u/µl) e Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP, 1u/µl) – Fermentas – utilizando 0,5 µl de Exo I e 2,0 µl de SAP para 5 µl de produto de PCR, deixando 50 minutos a 37°C e 15 minutos a 80°C, sendo posteriormente armazenado em freezer.

Para realização da reação de sequenciamento utilizou-se o kit “BigDye Sequence Terminator v.3.1” (Applied Biosystems). As seguintes condições foram aplicadas para cada reação: 1,0 µl da reação de PCR purificada; 2µl Sequencing Buffer; 0,5µl de primer (10pM, sendo que uma reação utilizou-se o *primer* para cadeia leve do *primer* e outra para a cadeia pesada); 5,5 µl de água destilada; 1µl BigDye® Terminator v3.1. As condições de amplificação foram as seguintes: 25 ciclos a 96°C por 30 segundos; 15 segundos a 50°C; 4 minutos a 60°C. Após término do ciclo de BigDye, os produtos foram precipitados utilizando-se o seguinte protocolo:

1. Adicionar 3µl de acetato de sódio 3M pH 5,5; 62,5 µl de etanol absoluto; 14,5 µl de água destilada por tubo de reação;
2. Homogeneizar cuidadosamente com auxílio de uma micropipeta e deixar os tubos no escuro por no mínimo 15 minutos;

3. Centrifugar por 20 minutos a 13000 rpm a temperatura ambiente;
4. Retirar cuidadosamente o sobrenadante com auxílio de micropipeta;
5. Adicionar 200 µl de etanol 70% gelado e centrifugar por 5 minutos a 13000 rpm a temperatura ambiente;
6. Retirar cuidadosamente o sobrenadante com auxílio de micropipeta e deixar os tubos durante 3 minutos a 95°C (com a tampa aberta) para evaporação do álcool;
7. Manter a -20°C até o momento da aplicação das amostras no sequenciador.
8. As amostras foram sequenciadas no Instituto de Química da Universidade de São Paulo (sequenciador ABI PRISM 3100 GeneticAnalyzer da Applied Biosystems/ fabricante HITACHI).

III.2.5. Análise das sequências

Após a realização do sequenciamento, dois tipos de arquivos foram obtidos, um contendo a sequência propriamente dita, e um contendo o eletroferograma (representação gráfica do sinal cromatográfico gerado pela passagem de cada nucleotídeo pelo detector do sequenciador).

As seqüências foram visualizadas e editadas utilizando o programa CodonCode Aligner 3.5.6. As sequências consensos foram verificadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando o programa “BlastN” (averiguando assim, a similaridade destas com sequências de DNA de outros lagartos) e foram alinhadas no programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999) utilizando o Clustal W (Thompson e col., 1994) estabelecendo as penalidades de abertura de *gap*=10 e extensão de *gap*=0,2, sendo o alinhamento obtido checado manualmente. O alinhamento do *c-mos* foi realizado com base na sequência de aminoácidos ao invés da sequência de nucleotídeos, permitindo um melhor ajuste dos *indels* propostos pelo Clustal W. Após a verificação do alinhamento, foi visualizado o quadro de leitura das sequências através do programa MEGA 4.0 (Kumar e col., 2008).

A verificação de saturação das substituições nas sequências analisadas foi realizada com auxílio do programa DAMBE (Xia e Xei, 2001) com modelo de distância Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993).

As análises filogenéticas foram realizadas com as regiões gênicas separadas e concatenadas, segundo os critérios de Máxima Parcimônia, Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana. Ao final das análises, foi construída uma única árvore através do método de consenso estrito (com corte em nível de 50%).

As análises de Máxima Parcimônia (MP) foram implementadas no programa PAUP 4.0b10 (Swofford, 2003), utilizando busca heurística (adição de passos – *stepwise addition*) com o algoritmo de rearranjo de ramos “tree bisection and reconnection” (TBR), com 1000 réplicas, sem atribuição de peso aos caracteres, que foram considerados como não ordenados. Os *gaps* foram tratados tanto como dados ausentes quanto como quinto estado para a Máxima Parcimônia.

As análises de Máxima Verossimilhança foram implementadas no programa Treefinder (Jobb e col., 2004), com os modelos evolutivos para cada gene e para cada posição do códon dos genes mitocondriais e nucleares (com exceção do 16S) gerados pelo próprio programa, utilizando busca heurística com 1000 réplicas. Para as análises dos genes combinados, as sequências foram concatenadas com o auxílio do programa Geneious 3.8.5 (Biomatters Ltd, 2008).

Para as análises Bayesianas (MB) foi utilizado o programa MrModeltest 2.3 (Nylander, 2004) para a escolha do modelo evolutivo de substituição nucleotídica mais apropriado para cada gene e para cada posição do códon dos genes (exceto 16S). As inferências bayesianas foram realizadas com o programa MrBayes 3.0b.4 (Ronquist e Huelsenbeck, 2003) no cluster da Universidade de Cornell (<http://cbsuapps.tc.cornell.edu/mrbayes.aspx>), com quatro cadeias markovianas para 4.000.000 gerações amostradas a cada 100 gerações e duas corridas. A árvore final foi obtida após o descarte das 10.000 primeiras gerações.

Diferentes índices de suporte foram empregados, de acordo com a análise, a fim de verificar a confiabilidade das topologias. Valores de *bootstrap* (Felsenstein, 1985) foram calculados para as análises de Máxima Parcimônia e Máxima Verossimilhança utilizando 1000 réplicas, com auxílio do programa PAUP 4.0b10 (Swofford, 2003) e Treefinder (Jobb e col., 2004), respectivamente. Para as topologias geradas por Máxima Parcimônia foram calculados ainda os índices de consistência (IC), índice de retenção (IR) e índice de consistência rescalonado (CR) através do programa PAUP 4.0b10

(Swofford, 2003) e o índice de decaimento de Bremer (Bremer, 1994) com auxílio do programa TreeRot v 3.0 (Sorenson, 1999).

As probabilidades *a posteriori*, no caso da análise bayesiana, foram calculadas no programa MrBayes. Valores de *bootstrap* entre 50 e 70 foram considerados baixos, entre 70 e 95 como moderados e iguais ou acima de 95, altos (Hillis e Bull, 1993) foram consideradas significantes as probabilidades posteriores acima de 0.95 (Kolaczkowski e Thornton, 2007). As filogenias foram visualizadas e editadas no programa FigTree v.1.2.3 (Rambaut, 2009).

Referencias Bibliográficas

- ALJANABI, S.M. E MARTINEZ, I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-pased techniques. *Nucleic Acids Res*, 25: 4692-4693.
- BAKER, R.J.; BULL, J.J.; 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.
- BREMER, K. 1994. Branch support and tree stability. *Cladistics*, 10: 295-304.
- BIOMATTERS Ltd. 2008. Programa Geneious 3,8.5. Disponível no site <http://www.geneious.com/download>.
- EICHER, E. 1966. An improved air-drying technique for recovery of all stages of meiosis in the mammalian testis.- *Mamml. chrom. Newsl.* 20: 74.
- FELSENSTEIN J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- FORD, C.F. E HAMERTON, J.L. 1956. A colchicine hypotonic citrate squash sequence for mammalian chromosomes.- *Stain Tech.* 31: 247-251.
- HALL, T.A. 1999. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser*, 41: 95-98.
- HENEGARIU, O; HEEREMA, N.A.; WRIGHT, L.L.; BRAY-WARD, P.; WARD, D.C.; VANCE, G.H. 2001. Improvements in Cytogenetic Slide Preparation: Controlled Chromosome Spreading, Chemical Aging and Gradual Denaturing. *Cytometry*, 43: 101-109.
- HILLIS, D.M. E BULL, J.J. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst. Biol.*, 42: 182-192.
- HOWELL, W.M. E BLACK, D.A. 1980. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36: 1014-1015.
- JOB, G.; VON HAESELER, A.; STRIMMER, K. 2004. TREEFINDER: A powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. *BMC Evolutionary Biology* 4:18, doi:10.1186/1471-2148-4-18.
- KOLACZKOWSKI, B. E THORNTON, J.W. 2007. Effects of Branch Length Uncertainty on Bayesian Posterior Probabilities for Phylogenetic Hypotheses. *Mol. Biol. Evol.* 24(9): 2108-2118.
- KUMAR, S; DUDLEY, J.; NEI, M.; TAMURA, K. 2008. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics*, 9: 299-306.
- NYLANDER, J.A.A. 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.

- PELLEGRINO, K.C.M.; RODRIGUES, M.T.; YONENAGA-YASSUDA, Y.; SITES J.W. 2001. A molecular perspective on the evolution of microteiid lizards (Squamata, Gymnophthalmidae), and a new classification for the family. *Biological Journal of the Linnean Society*, 74: 315-338.
- RAMBAUT, A. 2009. FigTree v1.2.2. Author, Edinburgh. Available at <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- RODRIGUES, M.T.; FREIRE, E.M.X.; PELLEGRINO, K.C.M.; SITES, J.W. 2005. Phylogenetic relationships of a new genus and species of microteiid lizard from the Atlantic forest of north-eastern Brazil (Squamata, Gymnophthalmidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 144: 543-557.
- RODRIGUES, M.T.; PELLEGRINO, K.C.M.; DIXO, M.; VERDADE, V.K.; PAVAN, D.; ARGOLO, A.J.S.; SITES, J.W. 2007. A new genus of microteiid lizard from the Atlantic forests of state of Bahia, Brazil, with a new generic name for *Colobosaura mentalis*, and a discussion of relationships among the Heterodactylini (Squamata, Gymnophthalmidae). *Am. Mus. Novitates*, 3565: 1-27.
- RONQUIST, E. E HUELSENBECK, J.P. 2003. Mr.Bayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19: 565-569.
- SCHMID, M. 1978. Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma*, 66: 361-388.
- SORENSEN, M.D. 1999. TreeRot, version 2. Boston University, Boston MA.
- SUMNER, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Expl. Cell. Res.*, 75: 304-306.
- SUMNER, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Expl. Cell. Res.*, 75: 304-306.
- SWOFFORD, D.L. 2003. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland.
- TAMURA, K. E NEI, M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and g + c- content biases. *Mol. Biol. Evol.*, 9: 678-687.
- THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBONS, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weighting matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22: 4673-4680.
- XIA, X. E XIE, Z., 2001 DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity*, 92: 371-373.
- YONENAGA-YASSUDA, Y. 1972. Polimorfismos cromossômicos em roedores brasileiros. São Paulo, 214p. Tese (Doutorado)- Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

Capítulo 1

Cariótipo da forma diplóide críptica unissexual de *Leposoma percarinatum* (Squamata, Gymnophthalmidae) e da espécie bissexual *Leposoma ferreirai* do baixo Rio Negro, Amazonas, Brasil ¹.

Abstract

Karyotypes of *Leposoma* show a clear differentiation between species of the *scincoides* group from Brazilian Atlantic Forest (2n= 52, without distinctive size groups of chromosomes) and those of the *parietale* group from the Amazon (2n= 44, with 20M+24m). In a previous study, we found that in the *parietale* group the parthenoform *Leposoma percarinatum* from the state of Mato Grosso, Brazil, exhibited a triploid karyotype (3n= 66) with 30 macrochromosomes and 36 microchromosomes. It was suggested that this karyotype arose after hybridization between a bisexual species with n= 22 (10M+12m) and a hypothetical unisexual cryptic diploid form of the *L. percarinatum* complex. Herein, we describe the karyotypes for two species of the *parietale* group occurring sympatrically in the Arquipélago das Anavilhanas, lower Rio Negro, in Amazonia (Brazil). The first represents a distinctive diploid parthenogenetic clone of the *L. percarinatum* complex, and the other is the recently described *Leposoma ferreirai*. Both species have 44 biarmed chromosomes clearly represented by 20 macrochromosomes and 24 microchromosomes and present Ag-NORs in one pair of the smallest sized microchromosomes; heteromorphism of size for these regions was detected in *L. percarinatum*. C-banding revealed blocks of constitutive heterochromatin on the telomeric and pericentromeric regions of macrochromosomes and some microchromosomes. The description of a diploid karyotype (2n= 44, 20M+24m) for the *L. percarinatum* complex and its sympatric congener *L. ferreirai* provides new insight for a better understanding of the origin of parthenogenesis in the *L. percarinatum* complex.

¹ Laguna, M.M.; Rodrigues, M.T.; Santos, R.M.L.; Yonenaga-Yassuda, Y.; Ávila-Pires, T.C.S.; Hoogmoed, M.S.; Pellegrino, K.C.M. (2010). Karyotypes of a cryptic diploid form of the unisexual *Leposoma percarinatum* (Squamata, Gymnophthalmidae) and the bisexual *Leposoma ferreirai* from the lower Rio Negro, Amazonian Brazil. Journal of Herpetology, 44: 153-157 (Anexo 2).

Resumo

O gênero *Leposoma* apresenta uma diferenciação cariotípica entre as espécies do grupo *scincoides*, cuja distribuição está restrita à Mata Atlântica ($2n= 52$, sem distinção entre macro e microcromossomos) e aquelas pertencentes ao grupo *parietale*, de distribuição Amazônica ($2n= 44$, $20M+24m$). Em um estudo anterior, foi observado que no grupo *parietale* a espécie partenogenética *Leposoma percarinatum* proveniente do estado do Mato Grosso (Brasil), apresentava um cariótipo triplóide ($3n= 66$, $30M+36m$). Foi sugerido que este cariótipo seria resultado de um evento de hibridação entre uma espécie bissexual com $n= 22$ ($10M+12m$) e uma forma diplóide unissexual críptica hipotética do complexo *L. percarinatum*. Neste trabalho, descrevemos o cariótipo de duas espécies do grupo *parietale* que ocorrem em simpatria no Arquipélago de Anavilhanas, baixo Rio Negro (Amazonas), sendo a primeira um clone partenogenético diplóide de *L. percarinatum* e a outra, a recém descrita *Leposoma ferreirai*. Ambas apresentaram 44 cromossomos de dois braços e cariótipo claramente dividido em 20 macrocromossomos e 24 microcromossomos e apresentaram as Ag-RONs em um dos menores pares de microcromossomos, sendo detectado um heteromorfismo de tamanho em *L. percarinatum*. O bandamento C revelou blocos de heterocromatina constitutiva nas regiões pericentroméricas e terminais dos macrocromossomos e de alguns microcromossomos. A descrição do cariótipo diplóide ($2n= 44$, $20M+24m$) para o complexo *L. percarinatum* e para a espécie simpátrica *L. ferreirai* fornece dados para uma melhor compreensão da origem da partenogênese no complexo *L. percarinatum*.

Introdução

Gymnophthalmidae é uma família monofilética muito diversificada composta por lagartos exclusivamente Neotropicais, abrangendo atualmente cerca de 180 espécies e 44 gêneros reconhecidos (Rodrigues e col., 2009; Kok, 2009). Citogeneticamente, ainda é uma família pouco conhecida com dados restritos a 40 espécies distribuídas em 20 gêneros (Pellegrino e col., 2001; Yonenaga-Yassuda e col., 2005). Embora poucas espécies tenham sido analisadas até o momento, uma diversidade cariotípica notável foi encontrada na família. Foram encontrados cariótipos com números diplóides que variam de $2n = 32$ (14M+18m) em *Bachia dorbignyi* a $2n = 62-64$ em *Nothobachia ablephara* (Pellegrino e col., 1999b, 2001), cromossomos sexuais heteromórficos (incluindo mecanismos simples e múltiplos de determinação de sexo) e cromossomos supernumerários (Yonenaga-Yassuda e Rodrigues, 1999; Pellegrino e col., 2001; Yonenaga-Yassuda e col., 2005). Além dessas, a família apresenta duas espécies partenogenéticas: *Gymnophthalmus underwoodii* e *Leposoma percarinatum* (Cole e col., 1990, 1993; Pellegrino e col., 2003; Yonenaga-Yassuda e col., 1995).

Apesar do tamanho do corpo relativamente pequeno (comprimento rostro-cloacal inferior a 50 mm), os lagartos gimnoftalmídeos do gênero *Leposoma* representam um componente considerável da serrapilheira de florestas tropicais da Costa Rica até a Amazônia e nas encostas de Mata Atlântica no leste do Brasil (Rodrigues, 1997; Rodrigues e Borges, 1997, Rodrigues e col., 2002; Rodrigues e Ávila-Pires, 2005). Tradicionalmente, as espécies de *Leposoma* foram reunidas em dois grupos com base na similaridade morfológica (Ruibal, 1952): *parietale* e *scincoides*. O grupo *parietale* atualmente inclui 10 espécies bissexuais (*Leposoma caparensis*, *L. ferreirai*, *L. guianense*, *L. hexalepis*, *L. ionna*, *L. osvaldoi*, *L. parietale*, *L. rugiceps*, *L. snethlageae* e *L. southi*) e uma espécie partenogenética (*L. percarinatum*) e apresenta distribuição amazônica (Esqueda, 2005; Rodrigues e Ávila-Pires, 2005; Uzzell e Barry, 1971). O grupo *scincoides* consiste em cinco espécies formalmente reconhecidas (*L. annectans*, *L. baturitensis*, *L. nanodactylus*, *L. puk* e *L. scincoides*) e, com exceção de *L. baturitensis* que é endêmica dos enclaves de floresta relictua encontrados nas caatingas do Estado do Ceará, todas são restritas à Mata Atlântica brasileira (Rodrigues, 1997; Rodrigues e Borges, 1997, Rodrigues e col., 2002).

O primeiro registro citogenético do gênero *Leposoma* incluiu dados de duas espécies do grupo *parietale* (*L. guianense* e *L. osvaldoi*; $2n= 44$, $20M+24m$) e uma do grupo *scincoides* (*L. scincoides*, $2n= 52$) (Pellegrino e col., 1999a). Após a coloração convencional, o cariótipo de *L. scincoides* com 52 acrocêntricos/subtelocêntricos com redução gradual de tamanho foi facilmente distinguível daqueles encontrados nas espécies do grupo *parietale* com $2n= 44$ representados por 10 pares de macrocromossomos e 12 pares de microcromossomos, cuja maioria possuía dois braços. Esse estudo revelou uma notável diferenciação cariotípica entre os dois grupos de *Leposoma*, que coincide com a estreita relação de cada grupo com as duas diferentes regiões de floresta tropical. Posteriormente, Pellegrino e col. (2003) descreveram um cariótipo triploide com $3n= 66$ ($30M+36m$) para três fêmeas da espécie partenogenética *L. percarinatum* provenientes de Vila Rica (Mato Grosso, Brasil), e propuseram que o cariótipo triploide teria resultado de um evento de hibridação entre uma espécie bissexual cujo cariótipo deveria ser semelhante a *L. guianense* / *L. osvaldoi* (células gaméticas com $n= 22$, $10M+12m$) e uma forma diplóide unissexual (com células gaméticas não reduzidas) até então não encontrada do complexo *L. percarinatum*. Uzzell e Barry (1971) já haviam sugerido que a partenogênese no gênero provavelmente seria originada por meio de hibridação entre espécies estreitamente relacionadas e, com base na distribuição geográfica, sugeriram *L. guianense* e *L. parietale* como possíveis candidatos a espécies parentais de *L. percarinatum*.

O trabalho de campo realizado em 2005 no Arquipélago das Anavilhanas, no estado do Amazonas, no baixo Rio Negro (Brasil), revelou a ocorrência de três espécies simpátricas (mas aparentemente não sintópicas) do grupo *parietale*: *L. percarinatum*, *L. guianense* e uma nova espécie bissexual (descrita no mesmo ano como *L. ferreirai*), esta última sugerida como uma possível espécie parental da espécie unissexual *L. percarinatum* (Rodrigues e Ávila-Pires, 2005). Segundo os autores, uma possível origem para a forma diplóide desses exemplares do complexo *L. percarinatum* poderia ser a hibridação entre *L. ferreirai* e *L. guianense*, enquanto a forma triploide encontrada em Mato Grosso (Pellegrino e col., 2003) representaria uma hibridação subsequente desta forma unissexual diplóide com *L. osvaldoi*, uma vez que *L. guianense* não ocorre tão ao sul.

Das três espécies encontradas na região de Anavilhanas, foram analisadas citogeneticamente as espécies *L. ferreirai* e *L. percarinatum*. As novas informações, complementadas por dados cromossômicos das espécies de *Leposoma* aqui relatados, fornecem novas evidências sobre a origem da partenogênese no gênero.

Material e Métodos

Três fêmeas de *L. percarinatum* (MTR 9939, 9940, 9941), coletados na base Terra Firme, Estação Ecológica de Anavilhanas, margem esquerda do Rio Negro (02°29' 19"S, 60°52'35"W), e duas fêmeas e um macho de *L. ferreirai* (MTR 9948, 9949, 9950) de Ilha do Açaí, Rio Negro (02°38'42.4"S, 60°45'49.5"W), ambas no estado do Amazonas, Brasil, receberam números de identificação de campo provisórios (MTR) e foram trazidos vivos para o Laboratório de Citogenética de Vertebrados, sendo posteriormente depositados na coleção herpetológica do Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo (MZUSP), no estado de São Paulo (Brasil).

Preparações cromossômicas foram obtidas a partir de intestino de acordo com Schmid (1978), e os cromossomos foram analisados após coloração convencional, coloração pelo nitrato de prata identificando as regiões organizadoras de nucléolo (Ag-RONs) e bandamento C (CBG), segundo Sumner (1972) e Howell e Black (1980). Somente as metáfases que permitiram a contagem segura do número de cromossomos foram consideradas nas análises.

Resultados e Discussão

As análises citogenéticas revelaram um número diplóide igual a 44, com 10 pares de macrocromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 12 pares de microcromossomos (Fig. 1.1 a, b) em 43 de 177 metáfases de *L. percarinatum* e em 33 de 163 metáfases de *L. ferreirai* (Tabela 1.1). Apesar da dificuldade em se obter preparações cromossômicas de boa qualidade em lagartos, especialmente a partir de células do epitélio intestinal, algumas metáfases permitiram claramente identificar a presença de 12 pares de microcromossomos de dois braços.

Ambas as espécies de *Leposoma* apresentaram os sítios Ag-RONs localizados na região terminal do braço longo de um par de microcromossomos pequeno (Fig. 1.1 c), e foi possível identificar um heteromorfismo intrapopulacional de tamanho em mais de 85 % das células analisadas para os três espécimes de *L. percarinatum* (Tabela 1.1; Fig. 1.1 c). A diferença de tamanho das Ag-RONs dos homólogos pode ser causada por diferenças na atividade entre as duas RONs (Amaro-Ghilardi e col., 2008) ou diferença no número de cópias das sequências ribossomais entre homólogos, originada por duplicação de trechos de sequências de uma das duas RONs (Schmid, 1982) ou *crossing-over* desigual entre as sequências repetitivas (Garcia e Moreira-Filho, 2008). Com os dados disponíveis até o momento, não é possível rejeitar qualquer uma dessas possibilidades para explicar o heteromorfismo de tamanho observado para as Ag-RONs na forma diplóide de *L. percarinatum*. O padrão de bandamento C obtido para as duas espécies de *Leposoma* revelou blocos heterocromáticos em regiões terminais e pericentroméricas de macrocromossomos e na região terminal de alguns microcromossomos (Fig. 1.2 a, b). Em *L. ferreirai* foi possível identificar bandas C pericentroméricas em alguns microcromossomos (Fig. 1.2 b).

Embora o tamanho amostral seja pequeno (somente três fêmeas), todos os espécimes coletados em Anavilhanas foram idênticos aos atribuídos à espécie *L. percarinatum*, da qual somente fêmeas foram obtidas em todas as populações estudadas até o presente momento. Baseado nessa informação, podemos assumir que a população de Anavilhanas estudada neste trabalho também compõe uma população partenogenética.

Figura. 1.1. Cariótipos de espécies do gênero *Leposoma* da Estação Ecológica de Anavilhanas, Amazonas, Brasil. (a) *Leposoma percarinatum*, fêmea, $2n=44$ (20M+24m) e (b) *Leposoma ferreirai*, macho, $2n=44$ (20M+24m), após coloração convencional. (c) Ag-RONs localizadas na região terminal de um par de microcromossomos pequeno em *L. percarinatum*, evidenciando as Ag-RONs heteromórficas (esquerda) e homomórficas (centro) e em *Leposoma ferreirai* (direita). Bar = 10 mm.

Figura. 1.2. Padrões pericentroméricos e teloméricos de bandamento C nas espécies (a) *Leposoma percarinatum* e (b) *Leposoma ferreirai*.

Tabela 1.1. Número de identificação dos exemplares de cada espécie analisada (ID), número de metáfases com $2n=44$ do total de metáfases analisadas em coloração convencional (CC) e o número de metáfases analisadas após coloração por nitrato de prata (Ag-RON) nas duas espécies de *Leposoma*. As porcentagens (%) de RONS heteromórficas (Rr) e homomórficas (rr) são apresentadas.

Species	ID	CC	Total Ag-RON	Rr (%)	rr (%)
<i>Leposoma. percarinatum</i> ($2n= 44, 20M+24m$)	MTR 9939	12/57	22	19 (86,4)	3 (13,6)
	MTR 9940	13/52	10	9 (90)	1 (10)
	MTR 9941	18/68	14	13 (92,9)	1 (7,1)
<i>Leposoma ferreirai</i> ($2n= 44, 20M+24m$)	MTR 9948	3/40	9	1 (11,1)	8 (88,9)
	MTR 9949	26/87	6	0 (0)	6 (100)
	MTR 9950	4/33	4	0 (0)	4 (100)

A descrição do cariótipo diplóide de $2n= 44$ (20M+24m), muito semelhante em coloração convencional e diferencial, para *L. percarinatum* e sua espécie bissexual próxima *L. ferreirai*, simpátricas na região do baixo do Rio Negro (Anavilhanas), contribuíram para uma melhor compreensão sobre a origem da partenogênese em *L. percarinatum* e para a determinação de sua suposta espécie parental. Sabemos agora que, dentro do complexo unissexual *L. percarinatum* há simultaneamente uma forma diplóide encontrada na área de Anavilhanas, que é simpátrica com *L. guianense* e *L. ferreirai*, e uma linhagem triplóide encontrada em Vila Rica, estado do Mato Grosso, Brasil (Pellegrino e col., 2003). Os dados do presente trabalho apóiam a hipótese proposta por Pellegrino e col. (2003) para a existência de um clone unissexual diplóide do complexo *L. percarinatum* e sua contribuição para a origem do clone triplóide.

Com base na distribuição geográfica, Rodrigues e Ávila-Pires (2005) propuseram um cenário para a evolução do clone unissexual diplóide do complexo *L. percarinatum* por meio da hibridação entre *L. ferreirai* e *L. guianense*, que também é corroborado pelos dados citogenéticos aqui relatados. Um exemplo seria o fato de *L. ferreirai*, *L. guianense*, e a forma diplóide de *L. percarinatum* compartilharem um cariótipo muito similar apresentando $2n= 44$ (20M+24m), com cromossomos de dois braços, um par de microcromossomos portadores das Ag-RONs, e padrões de bandas C bastante similares.

Quarenta casos de partenogênese natural são conhecidos até o momento, distribuídos em oito famílias de lagartos, e em quase todos os casos bem estudados a origem da partenogênese é

considerada híbrida (Kearney e col., 2009). Em Teiidae, família que se apresenta como grupo irmão de Gymnophthalmidae, há relatos de várias espécies unissexuais e todas apresentam um padrão clonal de herança e uma origem híbrida (Reeder e col., 2002). Semelhante ao que foi sugerido para *Leposoma* aqui, algumas espécies de *Cnemidophorus* e *Aspidoscelis* possuem clones partenogenéticos triplóides, produzidos por hibridação entre uma forma partenogenética diplóide de origem híbrida e espécies bissexuais estreitamente relacionadas (Cole e Dessauer, 1993; Reeder e col., 2002; Woolley e col., 2004).

Atualmente, todos os espécimes conhecidos (mais de uma centena) atribuído a *L. percarinatum* são do sexo feminino. Considerando que a localidade tipo da espécie é Peixe Boi, no estado do Pará (Brasil), cujos dados cariotípicos são desconhecidos, futuros trabalhos taxonômicos, acompanhados por informações precisas sobre a distribuição geográfica de formas partenogenéticas, ainda são necessários para resolver de maneira acurada a taxonomia deste complexo de espécies.

Embora os dados citogenéticos atuais possam contribuir para a compreensão da origem da partenogênese em *Leposoma*, estudos cromossômicos adicionais baseados em técnicas de coloração diferencial para os espécimes triplóides e outras espécies de *Leposoma* ainda são necessários para permitir que as homeologias possam ser inferidas e ampliar nosso conhecimento sobre a evolução cariotípica do gênero. Juntamente com dados cromossômicos, os resultados obtidos com base em estudos filogenéticos (KCM Pellegrino, MT Rodrigues, JD Harris, Y Yonenaga-Yassuda, e JW Sites Jr., dados não publicados) devem auxiliar no reconhecimento das linhagens parentais da espécie partenogenética do complexo *L. percarinatum*.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer ao Laboratório de Ictiogenética e a Dra. R. C. Amaro (IBUSP-SP) pela ajuda com preparações cromossômicas e ao IBAMA e a equipe da Estação Ecológica de Anavilhanas pela licença de coleta e ajuda em campo. Essa pesquisa foi financiada pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Referências bibliográficas

- AMARO-GHILARDI, R.C.; SILVA, M.J.J.; RODRIGUES, M.T.; YONENAGA-YASSUDA, Y. 2008. Chromosomal studies in four species of genus *Chaunus* (Bufonidae, Anura): localization of telomeric and ribosomal sequences after fluorescence in situ hybridization (FISH). *Genetica*, 134: 159–168.
- COLE, C.J. E DESSAUER, H.C. 1993. Unisexual and bisexual whiptail lizards of the *Cnemidophorus lemniscatus* complex (Squamata: Teiidae) of the Guiana region, South America, with descriptions of new species. *American Museum Novitates*, 3081: 1–30.
- COLE, C.J.; DESSAUER, H.C.; TOWNSEND, C.R.; ARNOLD, M.G. 1990. Unisexual lizards of the genus *Gymnophthalmus* (Reptilia, Teiidae) in the Neotropics: genetics, origin, and systematics. *American Museum Novitates*, 2994: 1–29.
- ESQUEDA, L.F. 2005. Un nuevo *Leposoma* (Squamata: Gymnophthalmidae) de la reserva forestal de Caparo, Estado Barinas, Venezuela. *Herpetotrópicos*, 2: 33–42.
- GARCIA, C. E MOREIRA-FILHO, O. 2008. Localization of ribosomal genes in three *Pimelodus* species (Siluriformes, Pimelodidae) of the São Francisco River: 5S genes as species markers and conservation of the 18S rDNA sites. *Genetics and Molecular Biology*, 31: 261–264.
- HOWELL, W.M. E BLACK, D.A. 1980. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36: 1014–1015.
- KEARNEY, M.; FUJITA, M.K.; RIDENOUR, J. 2009. Lost sex in reptiles: constraints and correlations. In I. Schön, K. Martens, and P. van Dijk (eds.), *Lost Sex*. Springer Scientific, Dordrecht, Netherlands.
- KING, M. 1980. C-banding studies on Australian hyliid frogs: secondary constriction structure and the concept of euchromatin transformation. *Chromosoma*, 80: 191–217.
- KOK, P.J.R. 2009. Lizard in the clouds: a new highland genus and species of Gymnophthalmidae (Reptilia: Squamata) from Maringma tepui, western Guyana. *Zootaxa*, 1992: 53–67.
- PELLEGRINO, K.C.M.; RODRIGUES, M.T.; YONENAGA-YASSUDA, Y. 1999a. Chromosomal evolution in Brazilian lizards of genus *Leposoma* (Squamata, Gymnophthalmidae) from Amazon and Atlantic forests: banding patterns and FISH of telomeric sequences. *Hereditas*, 131: 15–21.
- PELLEGRINO, K.C.M.; RODRIGUES, M.T.; YONENAGA-YASSUDA, Y. 1999b. Chromosomal polymorphisms due to supernumerary chromosomes and pericentric inversions in the eyelidless microteiid lizard *Nothobachia ablephara* (Squamata, Gymnophthalmidae). *Chromosome*

Research, 7: 247–254.

- PELLEGRINO, K.C.M.; RODRIGUES, M.T.; YONENAGA- YASSUDA, Y.; SITES, J.W. 2001. A molecular perspective on the evolution of microteiid lizards (Squamata, Gymnophthalmidae), and a new classification for the family. *Biological Journal of Linnean Society*, 74: 317–340.
- PELLEGRINO, K.C.M.; RODRIGUES, M.T.; YONENAGA-YASSUDA, Y. 2003. Triploid karyotype of *Leposoma percarinatum* (Squamata, Gymnophthalmidae). *Journal of Herpetology*, 37: 197–199.
- REEDER, T.W.; COLE, C.H.; DESSAUER, H.C. 2002. Phylogenetic relationships of whiptail lizards of the genus *Cnemidophorus* (Squamata: Teiidae): a test of monophyly, reevaluation of karyotypic evolution, and review of hybrid origins. *American Museum Novitates* 3365:1–61.
- RODRIGUES, M.T. 1997. A new species of *Leposoma* (Squamata, Gymnophthalmidae) from the Atlantic forest of Brazil. *Herpetologica*, 53: 383–389.
- RODRIGUES, M.T. E ÁVILA-PIRES, T.C. 2005. New lizard of the genus *Leposoma* (Squamata, Gymnophthalmidae) from the lower Rio Negro, Amazonas, Brazil. *Journal of Herpetology*, 39: 541–546.
- RODRIGUES, M.T. E D.M. BORGES. 1997. A new species of *Leposoma* (Squamata, Gymnophthalmidae) from a relictual forest in semiarid northeastern Brazil. *Herpetologica*, 53: 1–6.
- RODRIGUES, M.T.; DIXO, M.; ACCACIO, G.M.D. 2002. A large sample of *Leposoma* (Squamata, Gymnophthalmidae) from the Atlantic forests of Bahia, the status of *Leposoma annectans* Ruibal, 1952, and notes on conservation. *Papéis Avulsos de Zoologia*, 42: 103–117.
- RODRIGUES, M.T.; PAVAN, D.; CURCIO, F.; VERDADE, V.K.; CASSIMIRO, J.; PELLEGRINO, K.C.M. 2009. A new genus of microteiid lizard from the Caparaó Mountains, southeastern Brazil, with a discussion of relationships among Gymnophthalminae (Squamata). *American Museum Novitates*, 3673: 1–27.
- RUIBAL, R. 1952. Revisionary studies of some South American Teiidae. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology*, 106: 407–529.
- SCHMID, M. 1978. Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma*, 66: 361–388.
- SCHMID, M. 1982. Chromosome banding in Amphibia. VII. Analysis of the structure and variability of NORs in Anura. *Chromosoma*, 87: 327–344.
- SUMNER, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Expl. Cell. Res.*, 75: 304–306.

- UZZELL, T. E BARRY J.C. 1971. *Leposoma percarinatum*, A unisexual species related to *L. guianense*, and *Leposoma ioanna*, a new species from Pacific coastal Colômbia (Sauria, Teiidae). Postilla, Peabody Museum, 154: 1–39.
- WOOLLEY, S.C.; SAKATA, J.T.; CREWS, D. 2004. Tracing the evolution of brain and behavior using two related species of whiptail lizards: *Cnemidophorus uniparens* and *Cnemidophorus inornatus*. ILAR Journal, 45: 46–53.
- YONENAGA-YASSUDA, Y. E RODRIGUES, M.T. 1999. Supernumerary chromosome variation, heteromorphic sex chromosomes and banding patterns in microteiid lizards of the genus *Micrablepharus* (Squamata, Gymnophthalmidae). Chromosome Research, 7: 21–29.
- YONENAGA-YASSUDA, Y.; VANZOLINI, P.E.; RODRIGUES, M.T.; CARVALHO, C.M. 1995. Chromosome banding patterns in the unisexual microteiid *Gymnophthalmus underwoodi* in two related sibling species (Gymnophthalmidae, Sauria). Cytogenet. Cell Genet., 70: 29–34.
- YONENAGA-YASSUDA, Y.; RODRIGUES, M.T.; PELLEGRINO, K.C.M. 2005. Chromosomal banding patterns in the eyelid-less microteiid radiation: the $X_1X_2Y:X_1X_1X_2X_2$ sex chromosome system in *Calyptommatus*, and the karyotypes of *Psilophthalmus* and *Tretioscincus* (Squamata, Gymnophthalmidae). Genetics and Molecular Biology, 28: 700–709.

Capítulo 2

Caracterização citogenética de espécies da tribo Ecleopodini (Gymnophthalmidae, Squamata)

Abstract

Ecleopodini comprises about 30 species placed in seven currently recognized genera, number probably underestimated. Presenting only seven species karyotypically described, this chapter intends to contribute to new chromosomal information in the Ecleopodini. *Colobosauroides carvalhoi* exhibits diploid number of 44 chromosomes (20M+24m) and one acrocentric microchromosome pair carrying the Ag-NORs. *Dryadosaura nordestina* presented 48 chromosomes (20M+28m), being one of the six cytogenetically described species which present microchromosome number differing from 24, predominant within the family. Besides these species, the species *Arthrosaura reticulata*, *A. kockii*, *Leposoma annectans* and *L. nanodactylus* were also analyzed, though only partial data were obtained. The *Arthrosaura* species showed metaphases with chromosomes split into microchromosomes and macrochromosomes, *Leposoma nanodactylus* had a karyotype similar to *L. scincoides* with high numbers of chromosomes with gradual reduction in size and predominance of acrocentric and subtelocentric chromosomes, whereas *L. annectans* carries a few biarmed chromosomes and the rest has acrocentric and subtelocentric morphology in apparent size reduction. In *Leposoma ferreirai*, FISH technique with telomeric probe was performed and fluorescent signals were observed only in the terminal regions, unlike in other species of the *parietale* group that present interstitial telomeric sites (ITS). With all the available data of the tribe, there seems to be a tendency to retain karyotypes with macro- and microchromosomes, the characteristic only missing in *Leposoma* species of *scincoides* group.

Resumo

A tribo Ecleopodini compreende cerca de 30 espécies alocadas em sete gêneros atualmente reconhecidos, sendo este, possivelmente, um número subestimado. Como apenas sete espécies apresentam dados cariotípicos descritos, esse capítulo pretende contribuir com novas informações cromossômicas para seis espécies de Ecleopodini. *Colobosauroides carvalhoi* apresentou 44 cromossomos (20M+24m) e um par de microcromossomos acrocêntricos portadores de Ag-RONs. Já *Dryadosaura nordestina* apresentou número diplóide igual a 48 cromossomos (20M+28m), sendo uma das poucas espécies de microteídeos descrita citogeneticamente que apresenta um número de microcromossomos diferente de 24, que constitui maioria dentro da família. Além dessas espécies, foram analisadas as espécies *Arthrosaura reticulata*, *A. kockii*, *Leposoma annectans* e *L. nanodactylus*, entretanto foram obtidos apenas dados parciais. As espécies de *Arthrosaura* apresentaram metáfases compostas por macrocromossomos e microcromossomos, *Leposoma nanodactylus* apresentou cariótipo similar à *L. scincoides*, com elevado número de cromossomos apresentando redução gradual de tamanho e predomínio de cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos, e *L. annectans* apresentou alguns pares de cromossomos de dois braços e os demais acrocêntricos e subtelocêntricos em aparente redução de tamanho. Dando continuidade a estudos anteriores em *Leposoma ferreirai* foi realizada a técnica de FISH com sonda telomérica, não sendo observada nenhuma marcação intersticial (ITS), ao contrário do observado para as demais espécies do grupo *parietale* submetidas a essa técnica. Com base em todos os dados citogenéticos disponíveis para a tribo até o momento, nota-se um predomínio de cariótipos compostos por macro e microcromossomos, característica ausente apenas nas espécies de *Leposoma* do grupo *scincoides*.

Introdução

A subfamília Cercosaurinae (*sensu* Pellegrino e col., 2001) compreende as tribos Cercosaurini e Ecpleopodini (alteração de Ecpleopini para Ecpleopodini em Rodrigues e col., 2009), essa última composta por sete gêneros e cerca de 30 espécies: *Anotosaura* (*vanzolinia* e *collaris*), *Arthrosaura* (*guianensis*, *hoogmoedi*, *kockii*, *montigena*, *reticulata*, *synaptolepis*, *testigensis*, *tylery* e *versteegii*), *Colobosauroides* (*carvalhoi* e *cearensis*), *Dryadosaura* (*nordestina*), *Ecpleopus* (*gaudichaudii*), *Leposoma* (*annectans*, *baturitensis*, *nanodactylus*, *puk* e *scincoides* – grupo *scincoides* – *caparensis*, *ferreirai*, *guianense*, *hexalepis*, *ionna*, *osvaldoi*, *parietale*, *percarinatum*, *rugiceps*, *sneathlageae* e *southi* – grupo *parietale*) e, com base em similaridade morfológica, *Amapasaurus* (*tetradactylus*).

Anotosaura vanzolinia é um pequeno microteídeo semifossorial que, assim como as espécies de *Colobosauroides*, vive em áreas de caatinga com folhíço abundante, não sendo encontrado em áreas abertas ou nas caatingas mais rústicas (Rodrigues, 1988). *Dryadosaura nordestina* ocorre em fragmentos remanescentes de Mata Atlântica desde o estado do Rio Grande do Norte até o São Francisco no estado de Alagoas, sendo aparentemente restrita à costa (Rodrigues e col., 2005). *Ecpleopus gaudichaudii* e as espécies de *Leposoma* do grupo *scincoides* também ocorrem em regiões de Floresta Atlântica, com exceção de *Leposoma baturitensis*, restrita a um enclave de floresta de montanha nas caatingas do estado do Ceará (Eisenberg e col., 2004; Rodrigues e Borges, 1997). Já as espécies pertencentes aos gêneros *Arthrosaura*, *Amapasaurus* e as espécies de *Leposoma* do grupo *parietale* estão distribuídas pela Floresta Amazônica Brasileira e de outros países da América do Sul (Rodrigues, 1997; Ávila-Pires, 1995).

A descrição de novas espécies evidencia a riqueza e diversidade subestimada da família, e a descrição de novos gêneros, que se mostraram merofiléticos ou que não pertenciam a nenhum gênero já descrito, visa uma melhor organização sistemática, alocando exemplares cujos caracteres diferem dos demais microteídeos descritos. Entretanto, o trabalho de descrição é dificultado pela complexidade morfológica, resolução filogenética inadequada para responder muitas questões (baixo suporte, presença de

politomias e ramos cuja posição varia de acordo com as diferentes análises) e poucos exemplares coletados e disponíveis para análises (tanto morfológicas quanto moleculares e citogenéticas).

A dificuldade em coletar algumas espécies e, consequentemente, o número reduzido de animais disponibilizados para análises citogenéticas, dificulta o trabalho de descrição cariotípica, ainda mais levando em conta o baixo índice mitótico associado ao tamanho reduzido dos animais (resultando em pouco material de análise), a fragilidade dos animais (que nem sempre sobrevivem ao tempo de colchicina) e o material de suspensão de intestino, que fornece metáfases com condensação diferencial entre os homólogos e muita sobreposição, dificultam a obtenção de dados cariotípicos de qualidade na família. Isso explica o número reduzido de cariótipos descritos (cerca de 40) para a família sendo que boa parte deles é caracterizada apenas em coloração convencional e coloração diferencial básicas (Ag-RON e bandamento C), fazendo com que qualquer nova informação, mesmo que parcial, seja importante e contribua para o conhecimento cromossômico da família.

Apesar de toda essa diversidade e complexidade taxonômica, poucas são as espécies desta tribo que foram analisadas do ponto de vista citogenético, sendo que os dados cromossômicos estão disponíveis apenas para *Anotosaura vanzolinia* ($2n=46$, $22M+24m$), *Colobosauroides cearensis* ($2n=44$, $20M+24m$) (Pellegrino, 1998), e cinco espécies de *Leposoma*: *L. ferreirai* ($2n=44$, $20M+24m$), *L. guianense* ($2n=44$, $20M+24m$), *L. osvaldoi* ($2n=44$, $20M+24m$), *L. percarinatum* ($2n=44$, $20M+24m$ e $3n=66, 30M+36m$) e *L. scincoides* ($2n=52$) (Pellegrino e col., 1999a, Laguna e col., 2010) (Anexo 1). Com a descrição destes cariótipos, fica evidente a diferenciação cariotípica entre os dois grupos de *Leposoma* (grupo *parietale* apresentando $2n=44$, $20M+24m$ e *scincoides* apresentando $2n=52$) e que o cariótipo de *Anotosaura vanzolinia* provavelmente se originou a partir de rearranjos envolvendo os macrocromossomos, uma vez que o número dos microcromossomos permanece constante (Pellegrino, 1998).

Dessa forma, este capítulo pretende descrever citogeneticamente espécies da tribo Ecpleopodini disponíveis no Laboratório de Citogenética de Vertebrados, contribuindo para o conhecimento da variação cariotípica do grupo e reconhecendo possíveis tendências cromossômicas na tribo ou caracteres espécie-específicos, úteis na determinação das espécies.

Material e Métodos

Foram analisados citogeneticamente 21 exemplares de sete espécies da tribo Ecpleopodini (Tabela 2.1): *Arthrosaura kockii*, *Arthrosaura reticulata*, *Colobosauroides carvalhoi*, *Dryadosaura nordestina*, *Leposoma annectans*, *Leposoma ferreirai* e *Leposoma nanodactylus*. Os exemplares foram coletados em diversas localidades durante viagens de campo e de levantamento faunístico pelo grupo do Professor Dr. Miguel Trefaut Rodrigues, do Departamento de Zoologia do IBUSP.

As preparações cromossômicas foram obtidas a partir da suspensão de medula óssea de acordo com protocolo de Ford e Hamerton (1956), fígado, baço e pulmões de acordo com Yonenaga (1972), intestino segundo Schmid (1978) e células meióticas foram obtidas a partir de testículos segundo protocolo de Eicher (1966), sendo os cromossomos analisados após coloração convencional, coloração pelo nitrato de prata identificando as regiões organizadoras de nucléolo (Ag-RONs) (Howell e Black, 1980) e FISH utilizando sonda telomérica, seguindo protocolo do fabricante (Dako). As metáfases foram registradas com auxílio do programa Ikaros & Isis, v 5.0 (Metasystems 2004), de captura de imagem e os cariótipos foram montados com o auxílio do programa Photoshop CS3, levando-se em conta a morfologia, o tamanho e a posição centromérica dos cromossomos, dispostos em ordem decrescente de tamanho.

Tabela 2.1: Relação de espécies, número de registro do Laboratório de Citogenética de Vertebrados (LG) ou número de campo, sexo e procedência dos exemplares da tribo Ecleopodini analisados citogeneticamente.

Espécie	Exemplar	Sexo	Procedência
<i>Arthrosaura kockii</i>	LG 1283	M	Vila Rica – MT
	LG 1603	M	
	LG1604	F	
	LG 1605	M	
	LG 1606	F	
	977932	M	
<i>Arthrosaura reticulata</i>	LG 1495	?	Juruena – MT
	LG 1612	M	Aripuanã - MT
	LG 1613	M	
	968291	M	
<i>Colobosauroides carvalhoi</i>	LG 2122	M	Ibiapaba – CE
	LG 2126	M	
	LG 2127	M	
	LG 2128	M	
	LG 2129	M	
<i>Dryadosaura nordestina</i>	LG 1479	M	Mamanguape – PB
<i>Leposoma annectans</i>	LG 1414	M	Una – BA
<i>Leposoma ferreirai</i>	LG 2338	F	Ilha do Açaí – AM
	LG 2339	M	
	LG 2340	F	
<i>Leposoma nanodactylus</i>	LG 1778	M	Serra do Teimoso - BA

Resultados

O exemplar de *Dryadosaura nordestina* da localidade de Mamanguape (PB) apresentou um cariótipo com número diplóide de $2n = 48$, composto por 20 macro e 28 microcromossomos. Este número foi inferido a partir de células diplotênicas com 24 bivalentes (Fig. 2.1), separados em 10 macrocromossomos e 14 microcromossomos e de metáfases parciais de suspensão de fígado com 45, 46 ou 47 cromossomos, em que foi possível observar 10 pares de macrocromossomos, todos apresentando dois braços, e 14 pares de microcromossomos, grande maioria composta de dois braços (Fig. 2.2).

Dos cinco exemplares de *Colobosauroides carvalhoi* da localidade de Ibiapaba (CE) analisados, apenas um apresentou material com metáfases para a análise citogenética e o número diplóide encontrado, a partir de lâminas de suspensão de intestino, foi de $2n = 44$, com 10 pares de macrocromossomos e 12 pares de microcromossomos (Fig. 2.3). Células meióticas foram analisadas e apresentaram 22 bivalentes. O par 10 apresentou-se acrocêntrico ao contrário dos demais macrocromossomos, que possuem dois braços. A técnica de Ag-RON evidenciou um par de RONS localizadas na região terminal do braço longo de um par de microcromossomos acrocêntricos (Fig. 2.3, em destaque).

Dando continuidade aos estudos em *Leposoma*, foram analisadas novas lâminas de três exemplares de *Leposoma ferreirai* da Ilha do Açaí, no Arquipélago de Anavilhanas (AM) a partir de preparação direta de fígado e suspensão de intestino, para complementar as análises realizadas para o artigo apresentado no capítulo 1. Após a técnica de hibridação *in situ* fluorescente com sonda telomérica, foram observadas marcações somente nas regiões terminais de todos os cromossomos, inclusive dos microcromossomos, cujas marcações são conspícuas com relação ao tamanho dos cromossomos (Fig. 2.4).

Além dessas espécies, foram analisados outros indivíduos pertencentes às espécies *Arthrosaura kockii*, *Arthrosaura reticulata*, *Leposoma annectans* e *L. nanodactylus*, entretanto, não foi possível estabelecer o número diplóide devido ao baixo índice mitótico e baixa qualidade das metáfases. Algumas informações interessantes foram encontradas e referem-se à presença de macrocromossomos e microcromossomos observada nas duas espécies do

gênero *Arthrosaura* (Fig. 2.5 a e b). Com relação a *Leposoma nanodactylus* foi possível observar que o cariótipo da espécie é composto por um número elevado de cromossomos em redução gradual de tamanho e predomínio de cromossomos acrocêntricos e subtelocêntricos, similar ao observado em *L. scincoides*, espécie que também ocorre na Mata Atlântica (Figura 2.5 c). Já em *L. annectans*, o cariótipo apresentou os maiores pares com cromossomos de dois braços, e os demais, predominantemente acrocêntricos (Fig. 2.5 d).

Figura 2.1. Célula diplotênica de exemplar macho de *Dryadosaura nordestina*, com 24 bivalentes (10M+14m), o que sugere $2n=48$.

Figura 2.2. Metáfase parcial com 45 cromossomos de exemplar macho de *Dryadosaura nordestina*, grande maioria composta por dois braços, inclusive os microcromossomos.

Figura 2.3. Cariótipo de exemplar macho de *Colobosauroides carvalhoi*, com $2n = 44$ (20M+24m). Em destaque, o par de microcromossomo portador das Ag-RONs.

Figura 2.4. Metáfase de *Leposoma ferreirai* ($2n = 44$, 20M+24m) após a técnica de hibridação *in situ* fluorescente com sonda telomérica, evidenciando as marcações somente terminais.

Figura 2.5. Metáfases parciais de *Arthrosaura kockii* (a), *Arthrosaura reticulata* (b), *Leposoma nanodactylus* (c) e *Leposoma annectans* (d). Metáfases (a) e (b) evidenciando cariótipos com divisão entre macrocromossomos e microcromossomos, metáfase (c) evidenciando cromossomos de morfologia acrocêntrica com redução gradual de tamanho, similar ao cariótipo de *L. scincoides* e (d) evidenciando alguns pares portadores de dois braços bem maiores do que os demais, que são acrocêntricos.

Discussão

Embora algumas espécies da tribo apresentem o mesmo número diplóide, diversas características cromossômicas distinguem os cariótipos e podem contribuir para a citotaxonomia. As espécies *Colobosauroides carvalhoi*, *Leposoma ferreirai*, *L. percarinatum*, *L. osvaldoi* e *L. guianense* apresentam $2n=44$ (20M+24m), entretanto, *Colobosauroides carvalhoi* apresenta o par 10 acrocêntrico, diferentemente dos cariótipos das espécies de *Leposoma*, que apresentam todos os pares de macrocromossomos de dois braços. *Leposoma ferreirai* e *Leposoma percarinatum* diplóide diferem pela presença de Ag-RONs heteromórficas em mais de 85% das metáfases da espécie partenogenética *L. percarinatum* (Laguna e col., 2010), e *L. osvaldoi* apresenta as Ag-RONs em um par de macrocromossomos em oposição ao par de microcromossomos das demais espécies (Pellegrino e col., 1999a).

Um fato bastante curioso é a frequência com que o cariótipo $2n=44$ (20M+24m) aparece nesta família. Considerando as espécies descritas na literatura e no decorrer deste projeto, totalizam-se 47 espécies cariotipadas (Anexo 1) das quais 17 apresentam esse número diplóide e fórmula cariotípica, representando pouco mais de um terço das espécies descritas. Essas espécies estão distribuídas em três tribos (*sensu* Pellegrino e col., 2001), sendo elas: Ecleopodini, Gymnophthalmini e Cercosaurini (Cole e col., 1990, 1993; Pellegrino, 1998; Pellegrino e col., 1999a, 2001; Sherbrooke e Cole, 1972; Yonenaga-Yassuda, 1992; Yonenaga-Yassuda e col., 1995, 1996, 2005; Laguna e col., 2010; presente trabalho).

As espécies *Anotosaura vanzolinia* e *Dryadosaura nordestina* apresentaram número diplóide e fórmula cariotípica diferentes do cariótipo mais freqüente para a tribo ($2n=44$, 20M+24m). Em *A. vanzolinia*, provavelmente ocorreu um rearranjo envolvendo os macrocromossomos, uma vez que esta espécie apresenta 11 pares de macrocromossomos, sendo dois deles acrocêntricos (sugerindo evento de fusão/fissão cêntrica) e *D. nordestina* apresentou 14 pares de microcromossomos ao invés dos 12 pares, que é comum a quase todas as espécies de

microteídeos (Pellegrino, 1998; Pellegrino e col., 1999a; Cole e col., 1990, 1993; Sherbrooke e Cole, 1972; Yonenaga-Yassuda e col., 1996, 2005).

Essas diferenças cariotípicas podem apoiar a descrição do gênero *Dryadosaura* (Rodrigues e col., 2005) para alocar a espécie com $2n = 48$ cromossomos (20M+28m) em um gênero distinto de *Anotosaura*, cuja espécie *A. vanzolinia* apresentou $2n = 46$ (22M+24m).

Os exemplares da espécie *Leposoma ferrerae* descritos em Laguna e col. (2010) foram submetidos, no presente trabalho, à técnica de hibridação *in situ* fluorescente com sonda telomérica, a fim de uma comparação com os dados obtidos por Pellegrino e col. (1999a) para as espécies *Leposoma guianense*, *L. osvaldoi* e *L. scincoides*.

As espécies *L. guianense* e *L. osvaldoi* apresentaram marcações em todas as regiões terminais e ainda apresentaram marcações intersticiais (ITS) no primeiro par cromossômico em *L. guianense* e em três pares de cromossomos em *L. osvaldoi* (pares 1, 3 e 7). Já a espécie *L. scincoides*, apresentou marcação conspícua na região terminal do primeiro par, sendo as marcações intersticiais observadas indícios de rearranjos cromossômicos, compatíveis com o padrão de banda R observado, sugerindo rearranjos do tipo inversão pericêntrica do par 1 em *L. scincoides* e fusão cêntrica dos pares 1, 3 e 7 em *L. osvaldoi*, cujas marcações teriam se perdido nos pares 3 e 7 em *L. guianense*, já que esta espécie não apresentou ITS nesses pares (Pellegrino e col., 1999a).

Leposoma ferreirai apresentou o mesmo número diplóide, fórmula cariotípica e morfologia dos macrocromossomos que as demais espécies do grupo *parietale* descritas (*L. guianense* e *L. osvaldoi*), Ag-RONs em um par de microcromossomos como encontrado em *L. guianense* e padrões de bandamento C similar às duas espécies. Após a realização da técnica de FISH com sonda telomérica, não foram observadas ITS, podendo indicar perda das sequências teloméricas intersticiais após eventos de rearranjos cromossômicos (como sugerido por Pellegrino e col., 1999a, para a espécie *L. osvaldoi*) ou pode indicar mecanismos alternativos de fusão Robertsoniana. No último caso, a fusão provavelmente resulta de quebras em regiões subteloméricas e perda de sequências teloméricas (Nanda e col., 1995; Garagna e col., 1995;

Zhadanova e col., 2005). No entanto, sem o estabelecimento do bandamento longitudinal em *L. ferreirai* não é possível especular qual a possível razão de não terem sido observadas marcações intersticiais presentes nas demais espécies do grupo *parietale*.

L. nanodactylus e *L. annectans* se apresentam como espécies menos frequentes em coleções herpetológicas, sendo ainda mais raros os exemplares disponibilizados para a realização de estudos citogenéticos. Além disso, o tamanho reduzido dos animais e o baixo índice mitótico, inerente a este material de estudo, dificultam a obtenção de dados cromossômicos para muitas espécies, fazendo com que essas informações, mesmo que preliminares, sejam importantes e contribuam para o conhecimento das espécies.

L. nanodactylus apresentou um cariótipo bastante similar ao de *L. scincoides* com série gradual de tamanho em coloração convencional. Já *L. annectans*, outra espécie do grupo *scincoides*, apresentou um cariótipo único quando comparado ao das demais espécies de *Leposoma*, apresentando alguns pares maiores portadores de dois braços e os demais, predominantemente acrocêntricos, apresentando tamanho bem menor, podendo ser indicativo de um cariótipo rearranjado (eventos de fusão ou fissão cêntrica podem ter originado os cromossomos de dois braços) e derivado dentro do grupo *scincoides*.

Os dados citogenéticos de espécies do gênero *Leposoma*, mesmo considerando os dados parciais aqui apresentados, indicam que os grupos *parietale* e *scincoides* apresentam diferenças marcantes com relação a organização do cariótipo, além das diferenças morfológicas, moleculares e de distribuição geográfica (Ruibal, 1952; Pellegrino e col, submetido.; Rodrigues e Ávila-Pires, 2005; Uzzell e Barry, 1971). No entanto, novos estudos citogenéticos e moleculares ainda são necessários para o esclarecimento das relações filogenéticas entre as espécies do gênero e da tribo Ecleopodini. A utilização de coloração diferencial (especialmente Ag-RONs e bandamento C) tem se mostrado eficiente em discriminar espécies cujo cariótipo possui elevada similaridade em coloração convencional.

O caso do compartilhamento do número e fórmula cariotípica pode ser resultado de retenção das características ancestrais, por ocorrência de homoplasias devido à presença de *hotspots* em cromossomos específicos (Zhdanova e col., 2005), por apresentarem sequências repetitivas (como os elementos transponíveis) que têm se mostrado diretamente envolvidas em rearranjos cromossômicos (Dobigny e col., 2004) ou simplesmente por se tratar de um cariótipo que apresente um maior valor adaptativo.

De qualquer maneira, parece haver um conservadorismo no número de microcromossomos, igual a 24, em 32 espécies das 38 que apresentam divisão entre macrocromossomos e microcromossomos, sendo exceção as espécies *Bachia dorbignyi* (14), *Gymnophthalmus pleii* (22), *Anadia bitaeniata* e *Pholidobolus montium* (26) e *Bachia bresslaui* e *Dryadosaura nordestina* (28) (Cole e col., 1990, Gorman, 1970; Pellegrino, 1998; Pellegrino e col., 2001; presente trabalho). Dessa forma, é possível sugerir que grande parte da variabilidade cariotípica encontrada nos microteídeos deve-se, possivelmente, a rearranjos envolvendo os macrocromossomos.

Nenhum trabalho, até o momento, se propôs a investigar a natureza dos microcromossomos em lagartos ou verificar se estes mantêm a mesma constituição em todas as espécies que possuem 24 microcromossomos, número que também é recorrente em outras famílias de lagartos, como Tropiduridae e Polychrotidae (Kasahara e col., 1996; Bertolotto e col., 2002). A pintura cromossômica pode contribuir para essas investigações, tendo sido realizada em lagartos pela primeira vez por Giovannotti e col. (2009) na família Scincidae. Os autores propõem mais uma evidência para o monofiletismo da família e o posicionamento basal de dois gêneros que apresentam quatro pares subtelocêntricos e que, pela ocorrência de dois rearranjos Robertsonianos, teriam originado os cromossomos metacêntricos das demais espécies estudadas.

Com base nos cariótipos descritos até o momento, nota-se uma tendência dentro da tribo de conservar cariótipos compostos por macro e microcromossomos, sendo esta característica observada nas espécies *Anotosaura vanzolinia* ($2n = 46, 22M+24m$), *Colobosauroides carvalhoi*, *C.*

cearensis, *Leposoma guianense*, *L. ferreirai*, *L. osvaldoi*, *L. percarinatum* forma diplóide ($2n= 44$, $20M+24m$) e triplóide ($3n= 66$, $30M+36m$), *Dryadosaura nordestina* ($2n= 48$, $20M+28m$) e no gênero *Arthrosaura*, estando ausente apenas em *Leposoma scincoides*, e aparentemente em *L. nanodactylus* (Pellegrino, 1998; Pellegrino e col., 1999a, 2001, presente trabalho). Entretanto, com base apenas nestes dados pouco se pode dizer acerca da evolução cariotípica dentro da tribo Ecpleopodini, uma vez que não foram realizadas técnicas que permitissem a identificação de homeologias entre as espécies, faltando ainda investigar os cariótipos dos demais gêneros e espécies que pertencem a esta tribo. A caracterização citogenética, incluindo a utilização do bandamento cromossômico e/ou pintura cromossômica, permitirão o estabelecimento de homeologias, que juntamente com hipóteses filogenéticas robustas possibilitarão o entendimento dos processos que resultaram nas diferenças cariotípicas tanto da tribo Ecpleopodini como da família Gymnophthalmidae.

Referencias Bibliográficas

- ÁVILA-PIRES, T.C.S. 1995. Lizards of Brazilian Amazonia (Reptilia: Squamata). Zoologische Verhandelingen, 299 (1): 1-706.
- BERTOLOTTO, C.E.V.; PELLEGRINO, K.C.M.; RODRIGUES, M.T.; YONENAGA-YASSUDA, Y. 2002. Comparative cytogenetics and supernumerary chromosomes in the Brazilian lizard genus *Enyalius* (Squamata, Polychrotidae). Hereditas, 136: 51-57.
- COLE, C.J.; DESSAUER, H.C.; TOWNSEND, C.R.; ARNOLD, M.G. 1990. Unisexual lizards of the genus *Gymnophthalmus* (Reptilia, Teiidae) in the neotropics: Genetics, origin, and systematics. Am. Mus. Novitates, 2994: 1-29.
- COLE, C.J.; DESSAUER, H.C.; MARKEZICH, A.L. 1993. Missing link found: the second ancestor of *Gymnophthalmus underwoodi* (Squamata: Teiidae), a South American unisexual lizard of hybrid origin. Am. Mus. Novitates, 3055:1-13.
- DOBIGNY, G.; DUCROZ, J.F.; ROBINSON, T.J.; VOLOBOUEV, V. 2004. Cytogenetics and Cladistics. Systematic Biology, 53(3): 470-484.
- EICHER, E. 1966. An improved air-drying technique for recovery of all stages of meiosis in the mammalian testis.- Mamml. chrom. Newsl. 20: 74.
- EISEMBERG, C.C.; CASSIMIRO, J.; BERTOLUCI, J. 2004. Notes on the diet of the rare gymnophthalmid lizard *Eubleopis gaudichaudii* from southeastern Brazil. Herpetological Review, 35 (4): 336-337.
- FELSENSTEIN J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution, 39: 783-791.
- FORD, C.F. E HAMERTON, J.L. 1956. A colchicine hypotonic citrate squash sequence for mammalian chromosomes.- Stain Tech. 31: 247-251.
- GARAGNA, S.; BROCCOLI, D.; REDI, C.A.; SEARLE, J.B.; COOK, H.J.; CAPANNA, E. 1995. Robertsonian metacentrics of the house mouse lose telomeric sequences but retain some minor satellite DNA in the pericentromeric area. Chromosoma, 103: 685-692.
- GIOVANNOTTI, M.; CAPUTO, V.; O'BRIEN, P.C.; LOVELL, F.L.; TRIFONOV, V.; CERIONI, P.N.; OLMO, E.; FERGUSON-SMITH, M.A.; RENS, W. 2009. Skinks (Reptilia: Scincidae) have highly conserved karyotypes as revealed by chromosome painting. Cytogenet Genome Res., 127(2-4): 224-31.

- GORMAN, G.C. 1970. Chromosomes and systematics of the family Teiidae (Sauria, Reptilia). *Copeia*, 1970: 230-245.
- HOWELL, W.M. E BLACK, D.A. 1980. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36: 1014-1015.
- KASAHARA, S.; PELLEGRINO, K.C.M.; RODRIGUES, M.T.; YONENAGA-YASSUDA, Y. 1996. Comparative Cytogenetic Studies of Eleven Species of the *Tropidurus torquatus* Group (Sauria, Tropiduridae), with Banding Patterns. *Hereditas*, 125 (1): 37-46.
- LAGUNA, M.M.; RODRIGUES, M.T.; SANTOS, R.M.L.; YONENAGA-YASSUDA, Y.; ÁVILA-PIRES, T.C.S.; HOOGMOED, M.S.; PELLEGRINO, K.C.M. (2010). Karyotypes of a cryptic diploid form of the unisexual *Leposoma percarinatum* (Squamata, Gymnophthalmidae) and the bisexual *Leposoma ferreirai* from the lower Rio Negro, Amazonian Brazil. *Journal of Herpetology*, 44: 153-157.
- NANDA, I.; SCHNEIDER-RASP, S.; WINKING, H.; SCHMID, M. 1995. Loss of telomeric sites in the chromosomes of *Mus musculus domesticus* (Rodentia: Muridae) during Robertsonian rearrangements. *Chromosome Research*, 3: 399-409.
- 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). 127p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- PELLEGRINO, K.C.M.; RODRIGUES, M.T.; 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(1): 15-21.
- PELLEGRINO, K.C.M.; RODRIGUES, M.T.; YONENAGA-YASSUDA, Y.; SITES, J.W. 2001. A molecular perspective on the evolution of microteiid lizards (Squamata, Gymnophthalmidae), and a new classification for the family. *Biological Journal of Linnean Society*, 74: 317–340.
- RODRIGUES, M.T. 1988. Herpetofauna da caatinga. Em: *Ecologia e Conservação da Caatinga* (Ed. Leal I R, Tabarelli M, Silva J M C), Recife, Universidade Federal de Pernambuco, Cap. 4: 181-236.
- RODRIGUES, M.T. 1997. A new species of *Leposoma* (Squamata: Gymnophthalmidae) from the Atlantic forest of Brazil. *Herpetologica*, 53 (3): 383–389.

- RODRIGUES, M.T. E BORGES, D.M. 1997. A new species of *Leposoma* (Squamata: Gymnophthalmidae) from a relictual forest in semiarid Northeastern Brazil. *Herpetologica*, 53 (1): 1-6
- RODRIGUES, M.T.; FREIRE, E.M.X.; PELLEGRINO, K.C.M.; SITES, J.W. 2005. Phylogenetic relationships of a new genus and species of microteiid lizard from the Atlantic forest of north-eastern Brazil (Squamata, Gymnophthalmidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 144: 543-557.
- RODRIGUES, M.T. E ÁVILA-PIRES, T.C. 2005. New lizard of the genus *Leposoma* (Squamata, Gymnophthalmidae) from the lower Rio Negro, Amazonas, Brazil. *Journal of Herpetology*, 39: 541-546.
- RODRIGUES, M.T.; PAVAN, D.; CURCIO, F.; VERDADE, V.K.; CASSIMIRO, J.; PELLEGRINO, K.C.M. 2009. A new genus of microteiid lizard from the Caparaó mountains, southeastern Brazil, with a discussion of relationships among Gymnophthalminae (Squamata). *AM. Mus. Novitates*, 3673: 1-27.
- RUIBAL, R. 1952. Revisionary studies of some South American Teiidae. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology*, 106: 407-529
- SCHMID, M. 1978. Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma*, 66: 361-388.
- SHERBROOKE, W.C. E COLE, C.J. 1972. Chromosomes of the South American teiid lizard *Neusticurus ecpleopus* Cope and *Neusticurus strangulatus trachodus* Uzzell. *Copeia*, 1972: 886-889.
- UZZELL, T. E BARRY, J.C. 1971. *Leposoma percarinatum*, a unisexual species related to *L. guianense*; and *Leposoma ioanna*, a new species from Pacific coastal Colômbia (Sauria, Teiidae), Postilla, Peabody Museum, 154: 1-39.
- YONENAGA, Y. 1972. Polimorfismos cromossômicos em roedores brasileiros. São Paulo, 214p. Tese (Doutorado)- Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- YONENAGA-YASSUDA, Y. 1992. Citogenética da fauna das dunas interiores do rio São Francisco, com ênfase nos lagartos microteídeos (Sauria, Teiidae). *Rev. Bras. Genet. (supl.)*, 15: 106-111.
- YONENAGA-YASSUDA, Y.; VANZOLINI, P.E.; RODRIGUES, M.T.; CARVALHO, C.M. 1995. Chromosome banding patterns in the unisexual microteiid *Gymnophthalmus underwoodi* in two related sibling species (Gymnophthalmidae, Sauria). *Cytogenet. Cell Genet.*, 70: 29-34.
- YONENAGA-YASSUDA, Y.; MORI, L.; CHU, T.H.; 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.; RODRIGUES, M.T.; PELLEGRINO, K.C.M. 2005. Chromosomal banding patterns in the eyelid-less microteiid radiation: the $X_1X_2Y:X_1X_1X_2X_2$ sex chromosome system in *Calyptommatus*, and the karyotypes of *Psilophthalmus* and *Tretioscincus* (Squamata, Gymnophthalmidae). *Genetics and Molecular Biology*, 28(4): 700-709.
- ZHDANOVA, N.S.; KARAMISHEVA, T.V.; MININA, J.; ASTAKHOVA, N.M.; LANSDORP, P.; KAMMORI, M.; RUBTSOV, N.B.; SEARLE, J.B. 2005. Unusual distribution pattern of telomeric repeats in the shrews *Sorex araneus* and *Sorex granarius* *Chromosome Research*, 13:617–625.

Relações evolutivas entre os lagartos da tribo Ecleopodini (Gymnophthalmidae, Squamata):
uma abordagem molecular

Abstract

The family Gymnophthalmidae is far from being systematically well established, with no consensus regarding the number of subfamilies and tribes or the relations among the genera. To investigate the phylogenetic relationships in Ecleopodini (*sensu* Pellegrino, 2001) six genes were amplified: 16S, ND₄ (mtDNA) and *c-mos* (nuclear), both commonly used in molecular studies in these lizards, and the additional genes ND₂, cytochrome *b* and NT₃. The trees recovered similar relationships, with the exception of genes *c-mos* and cytochrome *b*. In the analyses of isolated genes, some genera were not recovered as monophyletic. Concatenated analyses recover the monophyly of the tribe, of the genera *Leposoma*, *Arthrosaura* and *Colobosauroides* and the clade composed of the genera *Anotosaura*, *Dryadosaura* and *Colobosauroides*. However, the relationship among the other genera could not be established, and could be indicative that genes do not present rates of evolution appropriate to recover the relations among the genera or that the tribe had a simultaneous and rapid diversification, which impedes the establishment of phylogenetic relations. The genus *Kaieuteurosaurus* was recovered as a genus within Ecleopodini, however, his position could not be established. Further studies with additional genes and data from different sources should be conducted in order to improve the levels of support and propose phylogenetic hypotheses within the tribe.

Resumo

A família Gymnophthalmidae está longe de ter a sistemática bem estabelecida, não havendo consenso quanto ao número de subfamílias e tribos ou as relações entre eles. Com o objetivo de investigar as relações filogenéticas de Ecleopodini (*sensu* Pellegrino, 2001) foram amplificados os genes 16S, citocromo *b*, ND₄ (mitocondriais) e *c-mos* (nuclear), comumente utilizados em trabalhos moleculares nesses lagartos, sendo adicionados os genes ND₂ e NT₃ na tentativa de aprimorar os suportes das relações filogenéticas. As árvores individuais recuperaram relações similares, com exceção dos genes citocromo *b* e *c-mos* que recuperaram alguns gêneros como merofiléticos. As análises concatenadas recuperam o monofiletismo da tribo, dos gêneros *Leposoma*, *Arthrosaura* e *Colobosauroides* e do clado composto por *Anotosaura*, *Dryadosaura* e *Colobosauroides*. No entanto, com exceção da análise Bayesiana que recupera o clado composto pelos três gêneros citados acima como grupo irmão de *Arthrosaura*, as relações entre os demais gêneros não puderam ser estabelecidas. Os altos valores de divergência genética sugerem que a tribo se diversificou de forma rápida e simultânea, o que dificulta o estabelecimento de grupos irmãos e explica as hipóteses filogenéticas conflitantes propostas na literatura. O gênero *Kaieuteurosaurus* foi recuperado dentro de Ecleopodini, entretanto, seu posicionamento não pode ser estabelecido. Novos estudos deverão ser conduzidos com o objetivo de melhorar os valores de suporte e propor hipóteses filogenéticas dentro da tribo.

Introdução

A utilização de dados moleculares, isolados ou associados a dados de outra natureza, tem contribuído para a realização de revisões taxonômicas e sistemáticas e estabelecimento de novas hipóteses filogenéticas em Squamata (Frost e col., 2001; Schulte e col., 2003; Townsend e col., 2004; Vidal e Hedges, 2005, 2009). As hipóteses filogenéticas propostas com base em dados moleculares diferem consideravelmente daquelas baseadas em dados morfológicos (Estes e col., 1988), recuperando Dibamidae como basal dentro da ordem, Gekkota em posição basal dentro de Lacertilia (ao invés de Iguania), Amphisbaenia como grupo irmão de Lacertidae e Serpentes recuperadas em um clado com Anguimorpha e Iguania (Townsend e col., 2004; Vidal e Hedges, 2005, 2009).

Com base nas filogenias moleculares, nota-se que alguns caracteres morfológicos constituem homoplasias, como a redução de membros, um dos caracteres utilizados para agrupar Serpentes, Amphisbaenia e Dibamidae em filogenias morfológicas. Outros caracteres, por sua vez, corroboram alguns clados estabelecidos com base em dados moleculares, como por exemplo o clado Bifurcata (presença de língua bifurcada em todos os Squamata com exceção de Dibamidae) (Vidal e Hedges, 2005, 2009).

Embora contribuam para uma melhor compreensão da sistemática, fatores como quantidade de genes utilizados, bem como a natureza destes (mitocondriais, nucleares, com taxas de evolução mais elevadas ou mais lentas), amostragem do grupo em estudo e de grupos externos podem influenciar a reconstrução filogenética com base em caracteres moleculares. Albert e col. (2008) demonstram que a atração de ramos longos pode agrupar táxons não recuperados na maioria das análises prévias (Serpentes e Acrodonta) e que algumas relações filogenéticas são dependentes da amostragem (Scincomorpha, Amphisbaenia e Serpentes têm posicionamento variável dependendo de quantas espécies são utilizadas por linhagem).

Saint e col. (1998), utilizando apenas o gene nuclear *c-mos*, recuperam a família Teiidae na base dos Squamata, distante das famílias com as quais tradicionalmente era agrupada (Estes e col., 1988; Macey e col., 1997). As filogenias realizadas posteriormente, utilizando regiões gênicas

adicionais, encontraram uma filogenia semelhante à obtida somente com o gene *c-mos*, entretanto, o clado composto por Teiidae e Gymnophthalmidae foi recuperado como grupo irmão do clado composto por Lacertidae e Amphisbaenia (Townsend e col., 2004; Vidal e Hedges, 2005, 2009).

A mesma problemática encontrada em Lacertilia também pode ser observada na família Gymnophthalmidae. Embora os trabalhos de sistemática molecular sejam pouco frequentes e recentes, é possível notar algumas incongruências, devido principalmente a amostragem de alguns grupos, seja pelas relações filogenéticas ou pela organização em categorias hierárquicas mais inclusivas, e clados cuja posição varia de acordo com as diferentes análises (Pellegrino e col., 2001; Castoe e col., 2004; Rodrigues e col., 2009). A raridade de algumas espécies em coleções herpetológicas, a presença de poucos dados disponíveis para análises e a riqueza subestimada da família dificultam o trabalho de organização sistemática da família.

Pellegrino e col. (2001) consideram quatro subfamílias e quatro tribos dentro da família (Alopoglossinae, Rhachisaurinae, Gymnophthalminae composta pelas tribos Gymnophthalmini e Hererodactylini, e Cercosaurinae, composta pelas tribos Ecpleopodini e Cercosaurini), sendo Ecpleopodini recuperada como grupo irmão de Cercosaurini e apresentando o gênero *Arthrosaura* em posição basal em análise de Máxima Parcimônia e Máxima Verossimilhança (nesta última, o gênero não é recuperado como monofilético). Já Castoe e col. (2004) apresentaram uma filogenia para os mesmos genes de Pellegrino e col. (2001), com exceção do gene nuclear 18S que não se mostrou informativo e com uma amostragem maior para a tribo Cercosaurini, consideram cinco subfamílias e apenas duas tribos (Alopoglossinae, Rhachisaurinae, Gymnophthalminae, Cercosaurinae e Ecpleopodinae, e as tribos Cercosaurini e Bachini). Além de elevarem a tribo Ecpleopodini para a categoria de subfamília, Castoe e col. (2004) encontraram-na como basal em relação à Rhachisaurinae, Gymnophthalminae (sem subdivisão nas tribos Heterodactylini e Gymnophthalmini), Cercosaurini e Bachini (nova tribo estabelecida). Além disso, dentro de Ecpleopinae, o gênero *Ecpleopus* aparece como basal (Fig. 1 – Introdução Geral). Posteriormente, Rodrigues e col. (2009) desmembram a tribo

Heterodactylini em duas tribos (Heterodactylini e Iphisiini), já recuperadas como dois clados com elevado suporte nas análises Bayesianas de Castoe e col. (2004).

Não somente o posicionamento da tribo Ecpleopodini (*sensu* Pellegrino e col., 2001; ou subfamília Ecpleopinae, *sensu* Castoe e col., 2004) na família ainda é controverso, como as relações entre seus gêneros e espécies ainda não foram totalmente estabelecidas, e o número de gêneros e espécies que a compõem ainda não está definido. Os gêneros monotípicos *Adercosaurus* (Myers e Donnelly, 2001), *Kaieteurosaurus* (Kok, 2005) e *Pantepuisaurus* (Kok, 2009) foram considerados membros da tribo Ecpleopodini com base em caracteres morfológicos e dados moleculares preliminares para os dois últimos gêneros, entretanto estudos adicionais devem ser realizados com esses gêneros para posicioná-los com maior segurança dentro da família. Além destes três, um outro gênero pertencente a tribo está para ser publicado e foi descrito a partir da análise de dois exemplares coletados em Iranduba (Amazonas, Brasil), apresentando similaridade com os gêneros *Anotosaura* e *Dryadosaura* (Peloso e col., no prelo).

Tendo em vista as incongruências entre as hipóteses filogenéticas propostas na literatura até o momento, a proposta de inclusão de três gêneros descritos nos últimos anos para a tribo Ecpleopodini e os dados moleculares escassos para a família e para esta tribo, o objetivo deste capítulo foi aumentar as informações genéticas disponíveis para Ecpleopodini, acrescentando uma região gênica mitocondrial e uma nuclear, investigar as relações filogenéticas da tribo e verificar se *Kaieteurosaurus* é um membro de Ecpleopodini, com base em dados moleculares.

Material e Métodos

O DNA de 25 exemplares das tribos Ecleopodini, Cercosaurini e Gymnophthalmini utilizados para as análises moleculares foi extraído seguindo o protocolo de Aljanabi e Martinez (1997), a partir de amostras de fígado, músculo da coxa ou cauda (Tabela 2 – Material e Métodos Geral). Foram adicionadas às análises, sequências de 16S, ND₄ e *c-mos* de *Kaieteurosaurus hindsi* proveniente da Guiana que, de acordo com dados morfológicos e dados moleculares preliminares, é um membro da tribo Ecleopodini com posicionamento incerto. Foram utilizados como grupos externos as tribos Cercosaurini (*Cercosaura ocellata* e *Placosoma glabellum*), Gymnophthalmini (*Scriptosaura catimbau*) e a subfamília Alopoglossinae (*Alopoglossus angulatus*) (Fig. 3.1 e 3.2).

Foram amplificados os genes 16S, citocromo *b*, ND₂, ND₄, *c-mos* e NT₃ (ciclo básico, quantidade e concentrações de reagentes, *primers* utilizados e condições de amplificação encontram-se nos itens II.2.2 e Tabelas 4 e 5 do Material e Métodos Geral). Os produtos de PCR purificados (utilizando as enzimas Exonuclease I e Shrimp Alkaline Phosphatase na proporção 0,5: 2µl para 5 µl de produto de PCR), foram então submetidos à reação de sequenciamento com o kit “BigDye Sequence Terminator v.3.1” (Applied Biosystems) (condições no item II.2.2. do Material e Métodos Geral).

As sequências foram visualizadas e editadas utilizando o programa CodonCode Aligner 3.5.6. As sequências consensos foram verificadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando o programa “BlastN” (averiguando assim, a similaridade destas com sequências de DNA de outros lagartos). As sequências consenso dos 25 exemplares cujo DNA foi extraído, de *Kaieteurosaurus hindsi* (sequências cedidas) e de *Leposoma scincoides* (sequências do GenBank) posteriormente alinhadas no programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999) utilizando o Clustal W (Thompson e col., 1994) estabelecendo as penalidades de abertura de *gap*=10 e extensão de *gap*=0,2. Os alinhamentos foram checados manualmente para confirmar bases duvidosas e para a retirada de *gaps* desnecessários ou inserções de *gaps*. E, após a verificação do alinhamento e visualizado o quadro de leitura das sequências através do programa MEGA 4.0 (Kumar e col., 2008), os genes foram concatenados com o auxílio do programa Geneious 3.8.5 (Biomatters Ltd, 2008).

Arthrosaura kockii

Arthrosaura reticulata

Anotosaura vanzolinia

Ecpleopus gaudichaudi

Leposoma ferreirai

Leposoma pecarinatum

Figura 3.1. Representantes de lagartos microteídeos da tribo Ecpleopodini utilizados nas análises moleculares. Para as espécies *Arthrosaura kockii*, *Arthrosaura reticulata*, *Leposoma ferreirai* e *Leposoma pecarinatum* também foram obtidos dados citogenéticos, apresentados nos capítulos 1 e 2 do presente trabalho.

Figura 3.2. Representantes dos lagartos das tribos Cercosaurini (*Cercosaura ocellata* e *Placosoma glabellum*), Gymnophthalmini (*Scriptosaura catimbau*, analisada citogeneticamente e cujos dados encontram-se no capítulo 4) e da subfamília Alopoglossinae (*Alopoglossus angulatus*), utilizados como grupos externos à Ecpleopodini.

A verificação de saturação das substituições nas seqüências analisadas foi realizada com auxílio do programa DAMBE (Xia e Xei, 2001) com modelo de distância Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993). Os melhores modelos evolutivos de substituição nucleotídica foram determinados através do uso do programa TreeFinder (Jobb e col., 2004) para Máxima Verossimilhança e MrModelTest 2.3 (Nylander, 2004) para as análises Bayesianas. E para cada gene foi calculada a distância genética não corrigida (“p”) com o auxílio do programa PAUP 4.0b10 (Swofford, 2003).

As análises de Máxima Parcimônia (MP) foram implementadas no programa PAUP 4.0b10 (Swofford, 2003), utilizando busca heurística (adição de passos – *stepwise addition*) com o algoritmo

de rearranjo de ramos “tree bisection and reconnection” (TBR), com 1000 réplicas na busca heurística, sem atribuição de peso aos caracteres, que foram considerados como não ordenados e os *gaps* foram tratados tanto como dados ausentes quanto como quinto estado. Foram também calculados os índices de consistência (IC), índice de homoplasia (IH), índice de retenção (IR), índice de consistência rescalonado (ICR).

As análises de Máxima Verossimilhança foram implementadas no programa Treefinder (Jobb e col., 2004), com os modelos evolutivos para cada gene e para cada posição do códon dos genes mitocondriais e nucleares (com exceção do 16S) gerados pelo próprio programa, utilizando a busca heurística com 1000 réplicas.

Para as análises Bayesianas (MB) foi utilizado o programa MrBayes 3.0 (Ronquist e Huelsenbeck, 2003), e as análises foram rodadas no cluster da Universidade de Cornell (<http://cbsuapps.tc.cornell.edu/mrbayes.aspx>), configurando as cadeias markovianas para 4.000.000 gerações, amostradas a cada 100 gerações e duas corridas. A árvore final foi obtida após o descarte das 10.000 primeiras gerações. Para essas análises também foi realizada a partição por códon, estabelecendo um modelo evolutivo para cada posição do códon.

Diferentes índices de suporte foram empregados, de acordo com a análise, a fim de verificar a confiabilidade das topologias. Valores de *bootstrap* (Felsenstein, 1985) foram calculados para as análises de Máxima Parcimônia e Máxima Verossimilhança utilizando 1000 réplicas com auxílio do programa PAUP 4.0b10 (Swofford, 2003) e TreeFinder (Jobb e col., 2004), respectivamente. O índice de decaimento ou índice de Bremer (Bremer, 1994) foi calculado para as topologias geradas por Máxima Parcimônia no programa TreeRot v 3.0 (Sorenson, 1999). As probabilidades posteriores, no caso da análise bayesiana, foram calculadas no programa Mr.Bayes. Valores de *bootstrap* entre 50 e 70 foram considerados baixos, entre 70 e 95 como moderados e iguais ou acima de 95, altos (Hillis e Bull, 1993). As árvores de consenso obtidas foram visualizadas e editadas no programa FigTree v.1.2.3 (Rambaut, 2009).

Foram realizadas análises de cada um dos genes individualmente, dos quatro genes mitocondriais concatenados, dos dois genes nucleares concatenados e dos seis genes concatenados utilizando os critérios de MP, MV e IB para os 27 exemplares cujas sequências foram amplificadas (totalizando 12 espécies da tribo em estudo e quatro espécies como grupos externos). Na tentativa de investigar a influência de algumas variáveis (ausência de dados para algumas espécies, amostragem e implementação de modelos evolutivos para cada partição das análises – genes e cada posição do códon) foram utilizados diversos conjuntos de dados: (1) excluindo *Kaieteurosaurus hindsi* e *Leposoma scincoides*, que apresentam apenas três das seis sequências gênicas utilizadas para os demais exemplares (Tabela 2 – Material e Métodos Geral); (2) excluindo as duas espécies supramencionadas e duas espécies do grupo externo (utilizando apenas as espécies da tribo Cercosaurini com grupo externo, de acordo com topologia de Pellegrino e col., 2001); (3) utilizando apenas um dos exemplares por espécie; (4) utilizando somente os genes cujas sequências foram amplificadas para *Kaieteurosaurus hindsi* (Tabela 2 – Material e Métodos Geral) e, por fim, (5) realizando análises com modelos para cada posição do códon.

Resultados

A verificação da saturação de substituições do tipo transição e transversão foi realizada para cada conjunto de dados para cada gene separadamente (Fig. 3.3). Com base no coeficiente de regressão (R^2), apenas o gene mitocondrial ND₄ apresentou saturação nas substituições do tipo transição uma vez que os dados não se adequam facilmente a uma reta (Guryev e col., 2001). Para contornar o problema de saturação de substituições, que geralmente ocorre na terceira base, foi realizada a partição dos genes por códon, escolhendo o melhor modelo evolutivo para cada posição do códon, ao invés de excluir a terceira base ou desconsiderar as transições uma vez que, dessa forma, o conjunto de informações disponíveis para a análise reduziria e haveria perda de variabilidade genética, informativa para o estabelecimento de relações filogenéticas.

Foram realizados testes para a verificação do sinal filogenético (teste de permutação – PTP – no programa PAUP) para os seis genes individuais. Para todos os conjuntos de dados, a distribuição dos escores obtidos através de permutação ao acaso da matriz de dados revelou a presença de sinal filogenético (valores de p igual a 0,001).

Comparando as hipóteses filogenéticas entre os diferentes conjuntos de dados, nota-se que não apresentaram diferenças tão marcantes, sendo mostrados, portanto, os dados com todos os indivíduos e fazendo considerações sobre as demais análises quando necessário. Existe uma variação nos valores de suporte, entretanto, geralmente permanecem nos mesmos intervalos (seguindo proposta de Hillis e Bull, 1993).

As análises dos seis genes concatenados com todos os exemplares (Fig. 3.4) recuperam o monofiletismo da tribo Ecpleopodini, dos gêneros *Leposoma*, *Colobosauroides* e *Arthrosaura* e de um clado composto pelos gêneros *Anotosaura*, *Colobosauroides* e *Dryadosaura* com suporte moderado a elevado (valores de *bootstrap* acima de 70 e probabilidade posterior superior a 0.95). Entretanto, com exceção das análises Bayesianas que apresentam uma melhor resolução filogenética (e elevados valores de probabilidade posterior), as relações entre os demais gêneros não puderam ser bem estabelecidas.

Figura 3.3. Gráficos da frequência observada de transições (◆) e transversões (■) versus a distância genética estimada pelo modelo Tamura-Nei para (a) 16S, (b) citocromo b (c) ND₂ (d) ND₄ (e) c-mos e (f) NT₃, com seus respectivos coeficientes de regressão.

Figura 3.4. – Reconstrução filogenética dos genes 16S, citocromo *b*, ND₂, ND₄, *c-mos* e NT₃ concatenados com os valores de suporte de MP / MV / IB / índice de Bremer, respectivamente, utilizando a árvore de Inferência Bayesiana como modelo. Os valores de *bootstrap* abaixo de 50 foram representados pelo símbolo “-” e todos os valores de probabilidade posterior foram apresentados.

Nas análises concatenadas utilizando o critério da Inferência Bayesiana, a tribo Cercosaurini é recuperada como grupo irmão de Eupleopodini, entretanto, nas demais análises os grupos externos são recuperados em um clado monofilético (exceto em MP, que *Alopoglossus* foi recuperado como basal) (Fig. 3.4).

Nas análises concatenadas, o clado composto pelas espécies do gênero *Leposoma* apresentou uma topologia diferente em cada um dos métodos de reconstrução filogenética. Utilizando o critério de MP (resultados na Tabela 3.1), a espécie *Leposoma ferreirai* é recuperada como espécie irmã da forma diplóide de *Leposoma percarinatum* com *bootstrap* igual a 98, recuperando a forma triplóide da espécie partenogenética como grupo irmão deste clado. Já a análise de MV recupera uma politomia entre os indivíduos da forma diplóide e triplóide de *Leposoma percarinatum* e com IB, as duas formas da espécie *Leposoma percarinatum* são recuperadas com elevado valor de probabilidade posterior.

Tabela 3.1. Composição nucleotídica, razão entre as transições e tranversões e *scores* obtidos pelo método de reconstrução de Máxima Parcimônia para as análises dos genes individuais e para as análises dos seis genes concatenados, utilizando todos os exemplares que foram amplificados.

	Regiões do genoma						
	16S	cit <i>b</i>	ND ₂	ND ₄	<i>c-mos</i>	NT ₃	Concatenada
Totais de sítios	513	603	480	625	406	605	3232
Sítios variáveis	176	259	291	303	171	196	1415
Sítios informativos	144	233	270	280	141	158	1226
Composição nucleotídica							
% A	30,9	28,3	34,2	31,0	27,0	32,1	34,2
% T/U	23,2	28,8	24,4	25,5	25,4	21,8	24,4
% C	24,9	27,5	30,3	30,5	23,5	21,3	30,3
% G	21,0	15,4	11,1	13,0	24,1	24,8	11,1
Razão Ti/TV	1,252	1,131	0,757	1,651	2,227	1,902	1,757
Nº de árvores	3	1	2	1	6	6	2
Nº de passos	704	664	908	1125	279	343	3993
IC	0,545	0,583	0,510	0,491	0,767	0,741	0,532
IR	0,696	0,714	0,718	0,564	0,886	0,855	0,677
ICR	0,379	0,416	0,366	0,277	0,679	0,633	0,361
IH	0,455	0,417	0,490	0,509	0,233	0,259	0,468

As análises dos genes ND₄ e *c-mos* e dos seis genes concatenados utilizando os 27 exemplares recuperam *Kaieteurosaurus hindsii* dentro da tribo Ecpleopodini, corroborando hipóteses prévias que este gênero pertencia a Ecpleopodini (Kok, 2009) (Fig. 3.4; 3.8; 3.9). Entretanto, sua posição ainda continua incerta, recuperada como grupo irmão do clado composto por *Anotosaura*, *Dryadosaura*, *Colobosauroides* (ND₄), do clado composto pelos gêneros *Leposoma* e *Ecpleopus* (concatenada), embora apresentem valores de *bootstrap* baixos em ML e elevados em IB.

Os genes 16S, citocromo *b* e *c-mos* (Fig. 3.5; 3.6; 3.9) não recuperam o monofiletismo da tribo, incluindo alguns grupos externos nas politomias envolvendo os clados recuperados para Ecpleopodini e os genes 16S, ND₄, NT₃ e algumas análises do gene ND₂ não recuperam *Arthrosaura* (*A. kockii* e *A. reticulata*) como monofilético. (Fig. 3.5; 3.7; 3.8; 3.10).

Os valores de distância genética par a par revelam uma elevada divergência nucleotídica, com a variação entre os gêneros da tribo com variação de 3,8 a 16,4% para o gene 16S; de 4,2 a 23,1% para citocromo *b*; de 7,3 a 27,4% para ND₂; de 9,2 a 26,6% para ND₄; de 0,2 a 24,8% para *c-mos*; e de 1,3 a 12,3 para o gene NT₃ (Anexo 3).

Figura 3.5 – Reconstrução filogenética do gene 16S com os valores de suporte de MP / MV / IB, respectivamente, utilizando a árvore de Inferência Bayesiana como modelo. Os valores de *bootstrap* abaixo de 50 foram representados pelo símbolo “-” e todos os valores de probabilidade posterior foram apresentados.

Figura 3.6 – Reconstrução filogenética do gene citocromo *b*, com os valores de suporte de MP / MV / IB, respectivamente, utilizando a árvore de Inferência Bayesiana como modelo. Os valores de *bootstrap* abaixo de 50 foram representados pelo símbolo “-” e todos os valores de probabilidade posterior foram apresentados.

Figura 3.7 – Reconstrução filogenética do gene ND₂, com os valores de suporte de MP / MV / IB, respectivamente, utilizando a árvore de Inferência Bayesiana como modelo. Os valores de *bootstrap* abaixo de 50 foram representados pelo símbolo “-” e todos os valores de probabilidade posterior foram apresentados.

Figura 3.8 – Reconstrução filogenética do gene ND₄, com os valores de suporte de MP / MV / IB, respectivamente, utilizando a árvore de Inferência Bayesiana como modelo. Os valores de *bootstrap* abaixo de 50 foram representados pelo símbolo “-” e todos os valores de probabilidade posterior foram apresentados.

Figura 3.9 – Reconstrução filogenética do gene *c-mos*, com os valores de suporte de MP / MV / IB, respectivamente, utilizando a árvore de Inferência Bayesiana como modelo. Os valores de *bootstrap* abaixo de 50 foram representados pelo símbolo “-” e todos os valores de probabilidade posterior foram apresentados.

Figura 3.10 – Reconstrução filogenética do gene NT₃, com os valores de suporte de MP / MV / IB, respectivamente, utilizando a árvore de Inferência Bayesiana como modelo. Os valores de *bootstrap* abaixo de 50 foram representados pelo símbolo “-” e todos os valores de probabilidade posterior foram apresentados.

Discussão

Foi possível recuperar o monofiletismo da tribo, dos gêneros *Leposoma*, *Colobosauroides* e *Arthrosaura* e de um clado composto pelos gêneros *Anotosaura*, *Dryadosaura* e *Colobosauroides* a partir as análises concatenadas (dos genes mitocondriais, mitocondriais e NT₃ e dos seis genes), entretanto, não foi possível estabelecer as relações entre os demais gêneros. Até mesmo as análises utilizando somente os dados mitocondriais, que apresenta fixação e estruturação populacional mais rápida, não conseguem recuperar as relações filogenéticas dentro da tribo, podendo ser indicativo de que a evolução desse grupo ocorreu de forma rápida, com uma diversificação simultânea a partir de um ou alguns ancestrais. As divergências genéticas apresentam valores elevados para todos os gêneros, entretanto, comparando as distâncias entre os gêneros *Anotosaura*, *Dryadosaura* e *Colobosauroides* é possível notar que os valores entre eles é mais baixo do que entre os demais e talvez a diversificação tenha ocorrido de forma mais lenta, até por isso talvez seja possível recuperar esses gêneros em um clado monofilético em todas as análises.

O monofiletismo do clado composto pelos gêneros *Anotosaura*, *Dryadosaura* e *Colobosauroides*, já havia sido proposto por Pellegrino e col. (2001), Castoe e col. (2004) e Rodrigues e col. (2005), sendo que a relação entre os três gêneros não estavam totalmente estabelecidas. Castoe e col. (2004) encontraram, nas análises Bayesianas, *Anotosaura vanzolinia* como grupo-irmão de *Colobosauroides cearensis*, relação também encontrada na análise de Máxima Verossimilhança realizada por Pellegrino e col. (2001), com suporte baixo e moderado, respectivamente. A análise de Máxima Parcimônia de Pellegrino e col. (2001), Castoe e col. (2004) e Rodrigues e col. (2005) recuperaram *Anotosaura* como grupo irmão de *Dryadosaura* com suporte baixo ou moderado. Com a adição dos genes NT₃ e ND₂, a relação entre *Dryadosaura* e *Anotosaura* é recuperada em alguns genes nos três métodos de reconstrução filogenética.

A amostragem de poucas espécies dentro de alguns gêneros (duas espécies de oito presentes em *Arthrosaura* e três espécies das 16 reconhecidas para *Leposoma* foram analisadas) e as

incongruências observadas na reconstrução filogenética de alguns genes (como *c-mos* e citocromo *b*) podem contribuir para a dificuldade de estabelecer as relações entre os gêneros de Ecleopodini.

Estudos realizados por Harris e col. (2001) e Harris (2003) demonstraram que as famílias Teiidae e Gymnophthalmidae apresentam taxas de mutação mais elevadas do que para os demais Squamata, sendo que a terceira posição dos códons normalmente fica saturada e que poderia ser responsável pelo posicionamento basal das famílias Teiidae e Gymnophthalmidae dentro dos Squamata, na filogenia proposta por Saint e col., (1998), Harris e col., (2001) e Harris (2003). Esse não parece ser o caso nessas análises, uma vez que o gene *c-mos* não apresentou indícios de saturação de substituições, entretanto, adicionando outros genes às análises do *c-mos* recupera-se topologias semelhantes àquelas da maioria dos genes individuais e das análises concatenadas (Fig. 3.9).

O gene citocromo *b* apresentou uma topologia diferente dos demais e para alguns indivíduos foram observadas regiões de *gaps* ou presença de códons de parada ao longo da sequência obtida. Como já foram relatados casos de ocorrência de pseudogenes do gene citocromo *b* em aves e mamíferos (Kornegay e col., 1992; Smith e col., 1993; Dubey e col., 2009), estas sequências foram retiradas das análises.

Kaieteurosaurus hindsi apresenta alguns caracteres morfológicos que raramente aparecem nos microteídeos (como as escamas ventrais hexagonais) que o assemelham a *Ecpleopus* e espécies de *Leposoma* do grupo *scincoides*. Além disso, compartilha algumas similaridades morfológicas com *Adercosaurus* e *Pantepuisaurus*, mas os três foram alocados em gêneros distintos por apresentarem combinações diferentes de caracteres diagnósticos (Kok, 2009). Assim, novos estudos com novos exemplares tornam-se necessários para que seja possível estabelecer a relação entre este gênero e os demais Ecleopodini.

Os dados obtidos no presente trabalho contribuem com uma nova visão sobre algumas relações filogenéticas incongruentes dentro da tribo Ecleopodini/subfamília Ecleopodinae (Pellegrino e col., 2001; Castoe e col., 2004) relatadas até o momento. A utilização de duas regiões gênicas adicionais em conjunto com os dados já utilizados nas reconstruções filogenéticas da família

não recupera uma árvore dicotômica ou ao menos mais resolvida, nem nas análises dos genes mitocondriais concatenados. Dessa forma, novos estudos utilizando dados de diferentes naturezas e com uma maior amostragem dentro da tribo deverão ser conduzidos na tentativa de elucidar as relações entre os indivíduos deste grupo.

Referências Bibliográficas

- ALBERT, E.M.; SAN MAURO, D.; GARCÍA-PARÍS, M.; RÜBER, L.; ZARDOYA, R. 2009. Effect of taxon sampling on recovering the phylogeny of squamate reptiles based on complete mitochondrial genome and nuclear gene sequence data. *Gene*, 441 (1-2): 12-21.
- ALJANABI, S.M. E MARTINEZ, I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-pased techniques. *Nucleic Acids Res*, 25: 4692-4693.
- BREMER, K. 1994. Branch support and tree stability. *Cladistics*, 10: 295-304.
- BIOMATTERS Ltd. 2008. Programa Geneious 3,8.5. Disponível no site <http://www.geneious.com/download>.
- CASTOE, T.A.; DOAN, T.M.; PARKINSON, C.L. 2004. Data partitions and complex models in Bayesian analysis: the phylogeny of Gymnophthalmidae lizards. *Systematic Biology*, 53(3): 448-469.
- DUBEY, S.; MICHAUX, J.; BRÜNNER, H.; HUTTERER, R.; VOGEL, P. 2009. False phylogenies on wood mice due to cryptic cytochrome-b pseudogen. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 50: 633-641.
- ESTES, R.; QUEIROZ, K.; GAUTHIER, J. 1988. Phylogenetic relationships within Squamata. In: *Phylogenetic relationships of the lizard families* (eds E. ESTES E G. PREGILL), Stanford, California, p.119-281
- FROST, D.R.; ETHERIDGE, R.; JANIES, D.; TITUS, T.A. 2001. Total evidence, sequence alignment, evolution of polychrotid lizards, and a reclassification of the Iguania (Squamata: Iguania). *Am. Mus. Novitates* 3343: 1-38.
- FELSENSTEIN J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.
- JOB, G.; VON HAESELER, A.; STRIMMER, K. 2004. TREEFINDER: A powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. *BMC Evolutionary Biology* 4:18, doi:10.1186/1471-2148-4-18.
- GURYEV, V.; MAKAREVITCH, I.; BLINOV, A.; MARTIN, J. 2001. Phylogeny of the Genus *Chironomus* (Diptera) Inferred from DNA sequences of Mitochondrial Cytochrome b and Cytochrome oxidase I. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 19 (1): 9-21.
- HALL, T.A. 1999. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows. *Nucl Acids Symp Ser*, 41: 95-98.
- HARRIS, D.J.; MARSHALL, J.C.; CRANDALL, K.A. 2001. Squamate relationships based on c-mos nuclear DNA sequences: increased taxon sampling improves bootstrap support. *Amphib. Reptil.* 22: 235-242.
- HARRIS, D.J. Codon bias variation in c-mos between squamate families might distort phylogenetic inferences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 27: 540-544, 2003.

- HILLIS, D.M. E BULL, J.J. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst. Biol.*, 42: 182-192.
- KOK, P.J.R. 2005. A new genus and species of gymnophthalmid lizard (Squamata: Gymnophthalmidae) from Kaieteur National Park, Guyana. *Bulletin de L'Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique, Biologie*, 75: 35-45.
- KOK, P.J.R. 2009. Lizard in the clouds: a new highland genus and species of Gymnophthalmidae (Reptilia: Squamata) from Maringma tepui, western Guyana. *Zootaxa*, 1992: 53-67.
- KORNEGAY, J.R.; KOCHER, T.D.; WILLIAMS, L.A.; WILSON, A.C. 1993. Pathways of lysozyme evolution inferred from the sequences of cytochrome b in birds. *Journal of Molecular Evolution*, 37(4): 367-379.
- KUMAR, S; DUDLEY, J.; NEI, M.; TAMURA, K. 2008. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics*, 9: 299-306.
- MACEY, J.R.; LARSON, A.; ANANJEVA, N.B.; FANG, Z.; PAPENFISS, T.J. 1997. Two Novel Gene Orders and the Role of Light-Strand Replication in Rearrangement of the Vertebrate Mitochondrial Genome. *Molecular Biology and Evolution*, 14(1): 91-104.
- MYERS C.W. E DONNELLY, M.A. 2001. Herpetofauna of the Yutajé-Corocoro Massif, Venezuela: Second report from the Robert G. Goellet American Museum-Terramar Expedition to the northwestern tepuis. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 261: 1-85.
- NYLANDER, J.A.A. 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- PELLEGRINO, K.C.M.; RODRIGUES, M.T.; YONENAGA-YASSUDA, Y.; SITES J.W. 2001. A molecular perspective on the evolution of microteiid lizards (Squamata, Gymnophthalmidae), and a new classification for the family. *Biological Journal of the Linnean Society*, 74: 315-338.
- RAMBAUT, A. 2009. FigTree v1.2.2. Author, Edinburgh. Available at <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- RODRIGUES, M.T.; FREIRE, E.M.X.; PELLEGRINO, K.C.M.; SITES JR., J.W. 2005. Phylogenetic relationships of a new genus and species of microteiid lizard from the Atlantic forest of north-eastern Brazil (Squamata, Gymnophthalmidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 144: 543-557.
- RODRIGUES, M.T.; CASSIMIRO, J.; PAVAN, D.; CURCIO, F.F.; VERDADE, V.K.; PELLEGRINO, K.C.M. 2009. A new genus of microteiid lizard from the Caparaó mountains, Southeastern Brazil, with a discussion of relationships among Gymnophthalminae (Squamata). *American Museum Novitates*, 3673: 1-27.
- RONQUIST, E. E HUELSENBECK, J.P. 2003. Mr.Bayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19: 565-569.
- SAINT, K.M.; AUSTIN, C.C.; DONNELLAN, S.C.; HUTCHINSON, M.N. 1998. C-mos, a nuclear marker useful for squamate phylogenetic analysis. *Mol. Phyl. Evol.* 10: 259-263.

- SCHULTE, J.A.; VALLADARES J.P.; 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
- SMITH, M.F.; THOMAS, W.K.; PATTON, J.L. 1992. Mitochondrial DNA-like sequence in the nuclear genome of an akodontine rodent. *Mol Biol Evol* 9 (2): 204-215.
- SORENSEN, M.D. 1999. TreeRot, version 2. Boston University, Boston.
- SWOFFORD, D.L. 2003. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland.
- TAMURA, K. E NEI, M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and g + c- content biases. *Mol. Biol. Evol.*, 9: 678-687.
- THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBONS, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weighting matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22: 4673-4680.
- TOWNSEND, T.M.; LARSON, A.; LOUIS, E.; MACEY, J.R. 2004. Molecular Phylogenetics of Squamata: The Position of Snakes, Amphisbaenians, and Dibamids, and the Root of the Squamate Tree. *Systematic Biology*, 53(5): 735-757.
- VIDAL, N. E HEDGES, S.B., 2005. The phylogeny of squamate reptiles (lizards, snakes and amphisbaenians) inferred from nine nuclear protein-coding genes. *C R Biol.* 328, 1000–1008.
- VIDAL, N. E HEDGES, S.B. 2009. The molecular evolutionary tree of lizards, snakes, and amphisbaenians. *CR Biologies*, 332: 129-139.
- XIA, X. E XIE. Z., 2001 DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity*, 92: 371-373

Capítulo 4

Descrição citogenética de *Scriptosaura catimbau*, novo gênero e espécie de microteídeo (Gymnophthalmidae, Squamata) e seu posicionamento na tribo Gymnophthalmini com base em dados moleculares.

Abstract

Scriptosaura catimbau, a new genus and species of microteídeo in the state of Pernambuco, was recently described and allocated within the tribe Gymnophthalmini, which currently gathers nine genera, of which all but *Scriptosaura* have been cytogenetically studied. The diploid number of $2n = 48$ was established for the new species, with the first four pairs having two arms and the others, mostly acrocentric, in gradual reduction of size; the Ag-NORs were located in a subtelocentric pair of small size and C-banding showed pericentromeric blocks of constitutive heterochromatin. The FISH technique with telomeric probe detected signals in the telomeric regions of all chromosomes in addition to small pericentromeric signals (ITS) in the first four pairs of biarmed chromosomes, indicating the occurrence of possible events of centric fusion / fission in the evolution of these three species. Using Heterodactylini as outgroup, whose cytogenetically described species presented $2n = 42$ (18M + 24 m), a hypothesis to explain the huge karyotypic variation in Gymnophthalmini would be a series of fission events from a hypothetical *Tretioscincus*-like ancestor, which presents the same karyotype. Analysis of Maximum Parsimony, Maximum Likelihood and Bayesian Inference based on 16S, ND4 and *C-mos* were performed in order to position the new genus within the tribe and recover, in the combined data, the new species as sister group of *Nothobachia* with low support in MP and high support in the other analyses, and this clade related to *Calyptommatatus*.

Resumo

Scriptosaura catimbau, um gênero e espécie de microteídeo do estado de Pernambuco recentemente descrito, foi alocado dentro da tribo Gymnophthalmini, que reúne atualmente nove gêneros, todos, com exceção de *Scriptosaura*, já estudados citogeneticamente. Foi estabelecido para a nova espécie o número diplóide de $2n=48$, com os quatro primeiros pares de dois braços e os demais, maioria acrocêntricos, em redução gradual de tamanho. As Ag-RONs localizaram-se em um par acrocêntrico de tamanho pequeno e o bandamento C evidenciou blocos de heterocromatina constitutiva pericentroméricos. Pela técnica de FISH com sonda telomérica foram evidenciados sinais nas regiões terminais de todos os cromossomos além de pequenos sinais pericentroméricos (ITS) nos quatro primeiros pares e em *Calyptommatus leiolepis* e *Nothobachia ablephara* evidenciou algumas marcações intersticiais, indicando a ocorrência de possíveis eventos de fusão/fissão cêntricas na evolução dessas três espécies. Utilizando como grupo externo microteídeos da tribo Heterodactylini, cujas espécies apresentam $2n=42$ (18M+24m), uma hipótese para explicar a enorme variação cariotípica na tribo Gymnophthalmini seria eventos de fissão a partir de um cariótipo ancestral hipotético semelhante ao de *Tretioscincus*, que apresenta esta mesma fórmula cariotípica. Análises concatenadas dos genes genes 16S, ND₄ e *c-mos* em Máxima Parcimônia, Máxima Verossimilhança e Análise Bayesiana recuperam *Scriptosaura* como grupo irmão de *Nothobachia* com suporte baixo em MP e elevado nas demais análises, e este clado relacionado a *Calyptommatus*.

Introdução

A subfamília Gymnophthalminae (*sensu* Pellegrino e col., 2001) é formada pelas tribos Iphisiini, Heterodactylini e Gymnophthalmini (*sensu* Rodrigues e col., 2009), esta última composta atualmente por nove gêneros: *Calyptommatus*, *Gymnophthalmus*, *Micrablepharus*, *Nothobachia* (monotípico), *Procellosaurinus*, *Psilophthalmus* (monotípico), *Scriptosaura* (monotípico), *Tretioscincus* e *Vanzosaura* (monotípico). É uma tribo caracterizada por gêneros sem pálpebras (com exceção de *Tretioscincus*) e com redução dos membros mais avançada nos membros anteriores (Rodrigues, 1991a, b, c).

Cinco dos nove gêneros da tribo foram descritos por Rodrigues na década de 90, e em 1995 o autor propôs o monofiletismo da tribo com base em 71 caracteres osteológicos, de morfologia externa e anatomia de hemipênis. O cladograma obtido pelo autor sugere que o grupo basal da radiação Gymnophthalmini é *Tretioscincus* (associado às florestas amazônicas) e os mais derivados como *Nothobachia* e *Calyptommatus*, que apresentam os membros anteriores bastante reduzidos (*Nothobachia ablephara* e *Calyptommatus* apresentam uma redução extrema do membro anterior, que apresenta-se na forma de um filete).

Posteriormente, Pellegrino e col. (2001) e Castoe e col. (2004) também recuperam o monofiletismo da tribo com base em dados moleculares do genoma mitocondrial e nuclear, embora as relações filogenéticas entre os gêneros da tribo e o suporte dos ramos variem de acordo com as análises (Fig. 1 – Introdução Geral).

Com exceção de *Vanzosaura* e *Gymnophthalmus*, cuja distribuição engloba as caatingas, os cerrados centro-brasileiros e o chaco, todos os demais gêneros têm sua história associada às dunas quaternárias do rio São Francisco, sendo *Procellosaurinus*, *Psilophthalmus*, *Nothobachia* e *Calyptommatus* endêmicos dessa região (Yonenaga-Yassuda e col., 2005). Ao contrário das regiões de caatinga próximas, que abriga uma fauna relativamente pobre em espécies, as dunas são caracterizadas pela alta diversidade e por uma fauna psamófila endêmica (36 lagartos e anfisbenas e 25 serpentes) (Rodrigues, 1996).

Um fato interessante é que diversas espécies localizadas em margens opostas do rio São Francisco são agrupadas como espécies irmãs, o que coincide com propostas de que a mudança no curso do rio poderia ter isolado populações em margens opostas e teriam atingido os níveis de diferenciação específico atual (Rodrigues, 1988).

Scriptosaura catimbau, um novo gênero e espécie da tribo Gymnophthalmini, proveniente do Parque Nacional do Catimbau (Pernambuco), não possui membros anteriores e os membros posteriores são reduzidos à apêndices estiliformes, sendo sugerido como grupo irmão de *Calyptommatus*, com base em caracteres morfológicos (Rodrigues e Santos, 2008). Esta tribo reúne atualmente nove gêneros, todos, com exceção de *Scriptosaura*, apresentando pelo menos uma espécie com cariótipos descritos (Anexo 1).

A grande diversidade cariotípica da tribo, com números diplóides variando entre $2n = 40$ ($16M+24m$) e $2n = 62-64$, a presença de dois tipos de cariótipos (os que apresentam separação entre macrocromossomos e microcromossomos e os de redução gradual de tamanho), presença de cromossomos B e de um sistema cromossômico múltiplo de determinação sexual, presença de uma espécie partenogenética que aparentemente constitui duas unidades taxonômicas distintas tornam a tribo Gymnophthalmini bastante interessante de ser estudada do ponto de vista citogenético (Cole, 1990, 1993; Yonenaga-Yassuda e col., 1995, 1996, 2005; Pellegrino e col., 1999b).

Dados morfológicos obtidos por Rodrigues (1995), assim como dados moleculares obtidos por Pellegrino e col. (2001), permitiram a reconstrução de uma hipótese filogenética em que *Tretioscincus*, com $2n = 42$ ($18M+24m$), é recuperado como gênero basal e *Nothobachia* e *Calyptommatus*, apresentando $2n = 62-64$ e $2n = 57/58$ (machos com $2n = 57$ e fêmeas com $2n = 58$ devido o sistema múltiplo de determinação de sexo) respectivamente, os gêneros mais derivados (Pellegrino e col., 1999b; Yonenaga-Yassuda e col., 2005).

Yonenaga-Yassuda e col. (2005) propõem que a evolução cariotípica da tribo se deu no sentido de aumento no número diplóide, com exceção das espécies de *Procellosaurinus* e *Vanzosaura* que apresentam $2n = 40$ ($16M+24m$), a partir de um cariótipo ancestral como o de *Tretioscincus* ($2n = 42$, $18M+24m$), e que diversos eventos de fissão cêntrica e inversões pericêntricas poderiam ter originado

os cariótipos que apresentam redução gradual de tamanho e predomínio de cromossomos acrocêntricos e subtelocêntricos.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho é descrever o cariótipo de *Scriptosaura catimbau* e compará-lo com os cariótipos das demais espécies da tribo. Além disso, utilizar sequências gênicas para investigar o posicionamento do gênero em relação aos demais gêneros da tribo e verificar se esses dados são concordantes com a filogenia baseada em dados morfológicos.

Material e Métodos

Foram obtidas preparações cromossômicas a partir de suspensão de células de fígado, intestino e testículo de 13 exemplares (Tabela 1 – Material e Métodos Geral) segundo protocolos de Yonenaga (1972), Schmid (1978) e Eicher (1966). Os animais foram sacrificados com éter quatro horas após injeção de colchicina *in vivo* 0,1% (na proporção de 0,1 ml/10 g de peso do animal) e, por se tratar de uma espécie nova e de tamanho reduzido, somente alguns exemplares foram tratados com solução de fitohemaglutinina 0,1% de 24 a 48 horas antes da aplicação da colchicina.

As lâminas obtidas foram analisadas em coloração convencional, após impregnação de nitrato de prata (Howell e Black, 1980), bandamento C (Sumner, 1972) e FISH com sonda telomérica (Telomere PNA FISH Kit/FITC (DAKO)), também aplicada às espécies *Nothobachia ablephara* e *Calyptommatus leiolepis*, cujos cariótipos já foram descritos (Yonenaga-Yassuda e col., 2005; Pellegrino e col., 1999b).

Após a amplificação dos genes 16S, citocromo b, ND₂, ND₄, *c-mos* e NT₃ de *Scriptosaura catimbau* utilizado como um dos grupos externos da tribo Ecpleopodini (Cap. 3), os genes 16S, ND₄ e *c-mos* foram utilizados para a reconstrução de uma filogenia para posicionar o novo gênero dentro da tribo. As sequências dos três genes dos demais gêneros foram retiradas do GenBank (Tabela 3 – Material e Métodos), utilizando duas espécies para os gêneros não monotípicos, e como grupos externos foram utilizados *Cercosaura ocellata* e *Ecpleopus gaudichaudii* (Cap. 3).

As sequências consenso foram alinhadas no programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999) utilizando o Clustal W (Thompson e col., 1994) estabelecendo as penalidades de abertura de *gap*=10 e extensão de *gap*=0,2, sendo posteriormente checado manualmente para confirmar bases duvidosas e para a retirada dos *gaps* desnecessários. Foi realizada a verificação do alinhamento, visualizado o quadro de leitura das sequências com o auxílio do programa MEGA 4.0 (Kumar e col., 2008), e para as análises concatenadas de Máxima Verossimilhança, os genes foram concatenados com o auxílio do programa Geneious 3.8.5 (Biomatters Ltd, 2008).

A verificação de saturação das substituições nas sequências analisadas foi realizada com auxílio do programa DAMBE (Xia e Xei, 2001) com modelo de distância Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993). Os melhores modelos evolutivos de substituição nucleotídica para os genes individuais e para cada posição do códon foram determinados por intermédio do programa TreeFinder (Jobb e col., 2004) para Máxima Verossimilhança e com auxílio do programa MrModelTest 2.3 (Nylander, 2004) para a Inferência Bayesiana.

As análises subsequentes foram realizadas com cada gene individualmente e com os três genes concatenados. As análises de Máxima Parcimônia (MP) foram implementadas no programa PAUP 4.0b10 (Swofford, 2003), utilizando busca heurística (adição de passos – *stepwise addition*) com o algoritmo de rearranjo de ramos “tree bisection and reconnection” (TBR), com 1000 réplicas e 1000 reamostragens, sem atribuição de peso aos caracteres, que foram considerados como não ordenados. Os *gaps* foram tratados tanto como dados ausentes quanto como quinto estado. Foram também calculados os índices de consistência (IC), índice de homoplasia (IH), índice de retenção (IR), índice de consistência rescalonado (ICR) e os valores de Bremer (Bremer, 1994), calculados com o auxílio do programa TreeRot v 3.0 (Sorenson, 1999).

As análises de Máxima Verossimilhança foram implementadas no programa Treefinder (Jobb e col., 2004), utilizando busca heurística, com 1000 réplicas. E as análises Bayesianas (IB) foram implementadas com o auxílio do programa MrBayes3.0 (Ronquist e Huelsenbeck, 2003) no cluster da Universidade de Cornell (<http://cbsuapps.tc.cornell.edu/mrbayes.aspx>), configurando as cadeias markovianas para 4.000.000 gerações amostradas a cada 100 gerações, com duas corridas simultâneas. A árvore final foi obtida após o descarte das 10.000 primeiras gerações.

Valores de bootstrap entre 50 e 70 foram considerados baixos, entre 70 e 95 como moderados e iguais ou acima de 95, altos (Hillis e Bull, 1993) e altos para valores de probabilidade posterior igual ou superior a 0,95 (Kolaczowski e Thornton, 2007). As filogenias foram visualizadas e editadas no programa FigTree v.1.2.3 (Rambaut, 2009).

Resultados

Para as análises filogenéticas, foi realizada a verificação da saturação de substituições do tipo transição e transversão, para cada gene separadamente, e mostrou que somente o gene ND₄ apresenta saturação nas transições (e leve saturação nas transversões) (Fig. 4.1). A taxa de transição por transversão, composição nucleotídica e informações sobre sítios informativos e *scores* de Máxima Parcimônia encontra-se na tabela 4.1.

Tabela 4.1. Resultados das análises dos genes 16S, ND₄ e *c-mos* isolados e da análise concatenada dos três genes sob o critério de Máxima Parcimônia (tratando *gaps* como quinto estado).

	Regiões do genoma			
	16S	ND ₄	<i>c-mos</i>	Concatenada
Totais de sítios	492	615	396	1503
Sítios variáveis	133	300	115	584
Sítios informativos	86	226	63	375
Composição nucleotídica				
% A	32,8	36,2	29,4	32,5
% T/U	22,4	25,7	28,0	25,4
% C	25,0	28,2	20,2	24,1
% G	19,8	9,9	22,5	18,0
Razão Ti/TV	1,094	1,093	2.126	1,208
Nº de árvores	8	1	7	2
Nº de passos	312	917	171	1414
IC	0,609	0,516	0,772	0,562
IR	0,498	0,384	0,672	0,428
ICR	0,303	0,198	0,519	0,241
IH	0,391	0,484	0,228	0,438

Nos três métodos de reconstrução filogenética das análises concatenadas, o monofilismo da tribo foi sustentado com elevado suporte (*bootstrap* de 100 em MP e ML e probabilidade posterior de 1.0 em IB) (Fig. 4.2), mas as relações entre os gêneros não puderam ser estabelecidas. As análises também recuperam o monofilismo dos gêneros *Calyptommatus*, *Gymnophthalmus*, *Micrablepharus* e *Procellosaurinus* (com valores de *bootstrap* elevados nas análises concatenadas e moderados em algumas análises de genes individuais), exceto para o gênero *Tretioscincus*, não recuperado como monofilético em boa parte das análises com os genes individuais (Fig. 4.3, 4.4 e 4.5). *Vanzosaura rubricauda* foi recuperada como espécie irmã do gênero *Procellosaurinus*, em análises de MV (com

bootstrap baixo) e IB (probabilidade posterior igual a 0,96 e 0,98, partição por gene e partição por códon, respectivamente), não sendo recuperado em análises combinadas em MP (Fig. 4.2). Análises individuais dos genes recuperam suporte elevado para *c-mos* com partição por códon, suporte moderado em análises com o mesmo gene em MP e *c-mos* e *c-mos* com partição por códon em MV (Figura 4.5).

Análises concatenadas dos genes ND₄ e *c-mos* em Máxima Verossimilhança e Análise Bayesiana recuperam *Scriptosaura* como grupo irmão de *Nothobachia* com suporte moderado ou elevado, apresentando suporte baixo em análises de MP do gene *c-mos*. Relacionado a esse clado está o gênero *Calyptommatus* com suporte elevado nas três análises (Figura 4.2).

Figura 4.1. Gráficos da frequência observada de transições (◆) e transversões (■) versus a distância genética estimada pelo modelo Tamura-Nei para (a) 16S, (b) ND₄, (c) *c-mos* (d) os três genes concatenados, com seus respectivos coeficientes de regressão.

Figura 4.2. Reconstrução filogenética com base nas sequências concatenadas das regiões gênicas 16S, ND₄ e *c-mos*. Os valores dos ramos correspondem respectivamente aos valores de *bootstrap* ou probabilidade posterior de MP/MV/IB. Os valores de *bootstrap* abaixo de 50 foram representados pelo símbolo “-” e todos os valores de probabilidade posterior foram apresentados.

Figura 4.3. Reconstrução filogenética com base nas sequências da região gênica mitocondrial 16S. Os valores dos ramos correspondem respectivamente aos valores de *bootstrap* ou probabilidade posterior de MP/MV/IB. Os valores de *bootstrap* abaixo de 50 foram representados pelo símbolo “-” e todos os valores de probabilidade posterior foram apresentados.

Figura 4.4. Reconstrução filogenética com base nas sequências da região gênica mitocondrial ND₄. Os valores dos ramos correspondem respectivamente aos valores de *bootstrap* ou probabilidade posterior de MP/MV/IB com partição por códon. Os valores de *bootstrap* abaixo de 50 foram representados pelo símbolo “-” e todos os valores de probabilidade posterior foram apresentados.

Figura 4.5. Reconstrução filogenética com base nas sequências da região gênica nuclear *c-mos*. Os valores dos ramos correspondem respectivamente aos valores de *bootstrap* ou probabilidade posterior de MP/MV/IB. Os valores de *bootstrap* abaixo de 50 foram representados pelo símbolo “-” e todos os valores de probabilidade posterior foram apresentados.

Dos 13 exemplares de *Scriptosaura catimbau* analisados citogeneticamente, 11 apresentaram índice mitótico razoável e foi possível estabelecer o cariótipo com número diplóide igual a 48 cromossomos, com os quatro primeiros pares meta/submetacêntricos e os demais pares acrocêntricos e subtelocêntricos, com redução gradual de tamanho (Fig. 4.6).

Células diplotênicas analisadas de um único exemplar macho apresentaram 24 bivalentes. As Ag-RONs localizam-se no braço curto de um par subtelocêntrico de tamanho pequeno (Fig. 4.6, em destaque) e o padrão de banda C encontrado é pericentromérico, com grandes blocos de heterocromatina constitutiva nos cromossomos de dois braços e dos acrocêntricos de tamanho intermediário (Fig. 4.7).

A técnica de hibridação *in situ* fluorescente com sonda telomérica evidenciou marcações nos telômeros de todos os cromossomos além de pequenos sinais pericentroméricos (ITS) nos quatro pares de cromossomos de dois braços (Fig. 4.8a) em exemplares de *Scriptosaura*. Em alguns cromossomos acrocêntricos existe correspondência entre o tamanho do bloco heterocromático com a marcação da sonda telomérica, o que não ocorre com as marcações observadas nos pares meta/submetacêntricos.

O padrão de distribuição das sequências teloméricas também foi obtido para *Calyptommatus leiolepis* ($2n=57/58$) e *Nothobachia ablephara* ($2n=62-64$), duas espécies relacionadas a *Scriptosaura* (Fig. 4.9). Em *Calyptommatus leiolepis*, foi possível observar uma marcação pericentromérica no par 1 metacêntrico e no braço curto do subtelocêntrico 2 (Fig. 4.8b), e em *Nothobachia ablephara* observou-se marcação conspícua na região terminal de um cromossomo acrocêntrico, possivelmente o par 6 (Fig. 4.8c), além das marcações em todos os telômeros.

Figura 4.6. Cariótipo de exemplar fêmea de *Scriptosaura catimbau*, com $2n = 48$, sendo os quatro primeiros pares de dois braços. Em destaque, o par de cromossomos portador das Ag-RONs.

Figura 4.7. Metáfase parcial de *Scriptosaura catimbau* após técnica de bandamento C, evidenciando grandes blocos de heterocromatina constitutiva nas regiões pericentroméricas dos cromossomos de dois braços e dos cromossomos acrocêntricos.

Figura 4.8. Metáfases parciais de (a) *Scriptosaura catimbau*, (b) *Calyptommatus leirolepis* e (c) *Nothobachia ablephara* após a técnica de hibridação *in situ* com sonda telomérica. As setas brancas indicam as marcações intersticiais (ITS), presentes nos cromossomos de dois braços.

Figura 4.9. Cariótipo de exemplar macho de *Calyptommatus leirolepis* (retirado de Yonenaga-Yassuda e col., 2005) em (a) e de exemplar fêmea de *Nothobachia ablephara* com cromossomos sexuais de macho no quadro em destaque (retirado de Pellegrino e col., 1999b) em (b).

Discussão

As análises filogenéticas concatenadas recuperam *Scriptosaura catimbau* como grupo irmão *Nothobachia* com elevado suporte nas análises de MV e IB (*bootstrap* igual a 97 e probabilidade posterior igual a 1.0), e recupera esse clado como grupo irmão de *Calyptommatus* (*bootstrap* igual a 96 em MP, 98 em MV e 1.0 em análises de IB). As análises individual dos genes ND₄ e *c-mos* recupera a relação (*Scriptosaura-Nothobachia*) com suporte moderado, exceto nas análises de MP do gene ND₄. Entretanto, diversas características morfológicas, como ausência de escama ocular e de uma escama temporal aumentada, são compartilhadas entre *Scriptosaura* e *Calyptommatus* (Rodrigues e Santos, 2008).

O cariótipo estabelecido para *Scriptosaura* é único entre as espécies da tribo (Anexo 1), apresentando um número diplóide de $2n = 48$, com os quatro primeiros pares apresentando dois braços e os demais, predomínio de cromossomos acrocêntricos, em redução gradual de tamanho. Mesmo apenas em coloração convencional o cariótipo do novo gênero é bastante diferente dos gêneros mais próximos com base em dados moleculares e morfológicos: *Nothobachia* e *Calyptommatus*, que são considerados os mais derivados e mais adaptados a fossorialidade, cuja redução de membros anteriores é mais extrema (Rodrigues, 1996). Ambas as espécies apresentam cariótipo com redução gradual de tamanho com predomínio de cromossomos acrocêntricos e subtelocêntricos, com exceção do par 1 de *Calyptommatus* que apresenta dois braços e é bem maior do que os demais, sendo resultado de um possível rearranjo Robertsoniano segundo Yonenaga-Yassuda e col. (2005).

Comparando os padrões de banda C dos três gêneros, a heterocromatina de *Calyptommatus leirolepis* encontra-se na região terminal de ambos os braços dos cromossomos (Yonenaga-Yassuda e col., 2005) e *Nothobachia ablephara* apresenta blocos conspícuos na região terminal do braço longo do par 1 e nos braços curtos dos cromossomos 6, 7 e 8 (Pellegrino e col., 1999b), padrões distintos do encontrado em *Scriptosaura*, que apresentou grandes blocos heterocromáticos nas regiões pericentroméricas de todos os cromossomos.

Scriptosaura catimbau apresentou marcações da sonda telomérica na região terminal de todos os cromossomos, além de ITSs discretas nos pares maiores de morfologia meta/submetacêntrica (Fig. 4.8a), que parecem estar associadas a um dos braços do cromossomo e não à região do centrômero ou de heterocromatina constitutiva, e podem estar relacionados com eventos de fusão/fissão cromossômica que originaria diferenças cariotípicas entre *Scriptosaura*, *Calyptommatus* e *Nothobachia*. Entretanto, em alguns cromossomos acrocêntricos de *Scriptosaura* parece haver correspondência entre o tamanho do bloco heterocromático com o tamanho da marcação da sonda telomérica. *Calyptommatus leiolepis* apresentou, além das marcações na região telomérica de todos os pares, uma ITS na região pericentromérica do par 1 metacêntrico e no braço curto do par 2 subtelocêntrico, enquanto que *Nothobachia ablephara* apresentou uma marcação conspícua na região telomérica do braço curto do par 6.

É mais aceito entre os citogeneticistas que a fusão cromossômica é um mecanismo de rearranjo mais provável do que a fissão para explicar a alteração no número diplóide. Isso porque a quebra de um cromossomo metacêntrico originaria dois cromossomos acrocêntricos instáveis e seria necessário originar novos centrômeros e telômeros nos novos cromossomos, o que sempre foi considerado improvável (Hayman, 1977). Entretanto, estudos realizados em primatas evidenciam a mudança na posição do centrômero sem que haja nenhum tipo de rearranjo ou alteração da ordenação de marcadores moleculares (visualizado com BACs) e demonstram a formação de neocentrômeros a partir de sequências repetitivas ou heterocromáticas, o que contornaria o problema de geração de cromossomos instáveis a partir de eventos de fissão cêntrica (Stanyon e col., 2008; Wong e Choo, 2001).

A maioria das repetições teloméricas está localizada nos telômeros, e alterações em sua localização podem originar rearranjos cromossômicos (Slijepcevic, 1998). Sinais teloméricos intersticiais (ITS) ocorrem frequentemente em regiões de heterocromatina constitutiva como sugere Meyne e col. (1990) e podem ser *hotspots* para quebras e recombinações cromossômicas espontâneas ou podem representar sítios em que os cromossomos se fundiram pelos telômeros (Hartmann e Scherthan, 2004; Kilburn e col., 2001).

Slijepcevic (1998) demonstrou que a inativação ou disrupção estrutural dos telômeros pode levar a fusão cromossômica em que as repetições teloméricas são retidas.

Utilizando como grupo externo microteídeos da tribo Heterodactylini (Pellegrino, 1998, Pellegrino e col., 2001), cujas espécies com cariótipos descritos apresentam $2n = 42$ (18M+24m), uma hipótese para explicar a enorme variação cariotípica na tribo Gymnophthalmini seria uma série de eventos de fissão de um cariótipo ancestral hipotético como o de *Tretioscincus* ($2n=42$, 18M+24m) (Yonenaga-Yassuda e col., 2005).

Com base no posicionamento do novo gênero, que recupera um clado cuja topologia é ((Nothobachia-Scriptosaura) Calyptommatus) é possível que eventos de fissão cêntrica, fusão cêntrica e translocações recíprocas tenham sido responsáveis para a diversificação cariotípica dos três gêneros relacionados, originando cromossomos de dois braços, os cromossomos múltiplos de determinação sexual observado em *Calyptommatus* e os cromossomos supernumerários em *Nothobachia ablephara*. No entanto, somente com a obtenção de filogenias com maior grau de resolução entre as relações dos gêneros e subfamílias de Gymnophthalmidae será possível propor como se deu a evolução cariotípica desse grupo.

Referencias Bibliográficas

- BREMER, K. 1994. Branch support and tree stability. *Cladistics*, 10: 295-304.
- BIOMATTERS Ltd. 2008. Programa Geneious 3,8.5. Disponible no site <http://www.geneious.com/download>
- CASTOE, T.A.; DOAN, T.M.; PARKINSON, C.L. 2004. Data partitions and complex models in Bayesian analysis: the phylogeny of Gymnophthalmidae lizards. *Systematic Biology*, 53(3): 448-469.
- EICHER, E. 1966. An improved air-drying technique for recovery of all stages of meiosis in the mammalian testis.- *Mamml. chrom. Newsl.* 20: 74.
- FELSENSTEIN J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.
- HALL, T.A. 1999. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser*, 41: 95-98.
- HAYMAN, D.L. 1977. Chromosome number – constancy and variation. In: *The biology of marsupials* (Stonehouse B and Gilmore D, eds). London: Macmillan; 27-48.
- HARTMANN, N. E SCHERTHAN, H. 2004. Characterization of ancestral chromosome fusion points in the Indian muntjac deer. *Chromosoma*, 112: 213-220.
- HILLIS, D.M. E BULL, J.J. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst. Biol.*, 42: 182-192.
- HOWELL, W.M. E BLACK, D.A. 1980. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36: 1014-1015.
- JOBB, G.; VON HAESELER, A.; STRIMMER, K. 2004. TREEFINDER: A powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. *BMC Evolutionary Biology* 4:18, doi:10.1186/1471-2148-4-18.
- KILBURN, A.E.; SHEA, M.J.; SARGENT, R.G.; WILSON, J.H. 2001. Insertion of a telomere repeat sequence into a mammalian gene causes chromosome instability. *Mol Cell Biol*, 21: 126-135.
- KOLACZKOWSKI, B. E THORNTON, J.W. 2007. Effects of Branch Length Uncertainty on Bayesian Posterior Probabilities for Phylogenetic Hypotheses. *Mol. Biol. Evol.* 24(9): 2108-2118.
- KUMAR, S; DUDLEY, J.; NEI, M.; TAMURA, K. 2008. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics*, 9: 299-306.

- 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.; MOYZIS, R.K. 1990. Distribution of non-telomeric sites of (TTAGGG)_n telomeric sequence in vertebrate chromosomes. *Chromosoma* 99: 3-10.
- NYLANDER, J.A.A. 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- 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). 127p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- PELLEGRINO, K.C.M.; RODRIGUES, M.T.; YONENAGA-YASSUDA, Y. 1999b. Chromosomal polymorphisms due to supernumerary chromosomes and pericentric inversions in the eyelidless microteiid lizard *Nothobachia ablephara* (Squamata, Gymnophthalmidae). *Chromosome Research*, 7(4): 247-254.
- PELLEGRINO, K.C.M.; RODRIGUES, M.T.; YONENAGA-YASSUDA, Y.; SITES J.W. 2001. A molecular perspective on the evolution of microteiid lizards (Squamata, Gymnophthalmidae), and a new classification for the family. *Biological Journal of the Linnean Society*, 74: 315-338.
- RAMBAUT, A. 2009. FigTree v1.2.2. Author, Edinburgh. Disponível no site: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- RODRIGUES, M.T. 1988. Estudos sobre a especiação e ecologia da fauna das dunas interiores do rio São Francisco, BA.: implicações paleoambientais. *Boletim IG-USP. Série Científica, Brasil*, v. 16, p. 101-102.
- RODRIGUES, M.T. 1991a. Herpetofauna das dunas interiores do rio São Francisco, Bahia, Brasil. III. *Procellosaurinus*: um novo gênero de microteídeos sem pálpebra, com a redefinição do gênero *Gymnophthalmus* (Sauria, Teiidae). *Papéis Avulsos de Zoologia*, 37(21): 329-342.
- RODRIGUES, M.T. 1991b. Herpetofauna das dunas interiores do rio São Francisco, Bahia, Brasil. II. *Psilophthalmus*: um novo gênero de microteídeos sem pálpebra (Sauria, Teiidae). *Papéis Avulsos de Zoologia*, 37(20): 321-327.
- RODRIGUES, M.T. 1991c. Herpetofauna das dunas interiores do rio São Francisco, Bahia, Brasil. I. Introdução à área e descrição de um novo gênero de microteídeos (*Calypptommatius*) com notas sobre sua ecologia, distribuição e especiação (Sauria, Teiidae). *Papéis Avulsos de Zoologia*, 37(19): 285-320.
- RODRIGUES, M.T. 1995. Filogenia e história geográfica de uma radiação de lagartos microteídeos (Sauria, Teiioidea, Gymnophthalmidae). Tese de Livre Docência, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo

- RODRIGUES, M.T. 1996. Lizards, snakes and amphisbaenians of the quaternary sand dunes of the rio Sao Francisco: Bahia: Brazil.. *Journal of Herpetology*, Estados Unidos, v. 30, n. 04, p. 513-523.
- RODRIGUES, M.T. E SANTOS, E.M. 2008. A new genus and species of eyelid-less and limb reduced gymnophthalmid lizard from northeastern Brazil (Squamata, Gymnophthalmidae). *Zootaxa*, 1873: 50-60.
- RODRIGUES, M.T; PAVAN, D.; CURCIO, F.; VERDADE, V.K.; CASSIMIRO, J.; PELLEGRINO, K.C.M. 2009. A new genus of microteiid lizard from the Caparaó mountains, southeastern Brazil, with a discussion of relationships among Gymnophthalminae (Squamata). *AM. Mus. Novitates*, 3673: 1-27.
- RONQUIST, E. E HUELSENBECK, J.P. 2003. Mr.Bayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19: 565-569.
- SCHMID, M. 1978. Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in Bufo and Hyla. *Chromosoma*, 66: 361–388.
- SLIJEPCEVIC, P. 1998. Telomeres and mechanisms of Robertsonian fusion. *Chromosoma* 107: 136-140.
- SORENSEN, M.D. 1999. TreeRot, version 2. Boston University, Boston MA.
- SUMNER, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Expl. Cell. Res.*, 75: 304-306.
- STANYON, R.; ROCCHI, M.; CAPOZZI, O.; ROBERTO, R.; MISCEO, D.; VENTURA, M., CARDONE, M.F.; BIGONI, F.; ARCHIDIACONO, N. 2008. Primate chromosome evolution: Ancestral karyotype, marker order and neocentromeres. *Chromosome Research*, 16: 17-39.
- SUMNER, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Expl. Cell. Res.* 75: 304-306.
- SWOFFORD, D.L. 2003. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland.
- TAMURA, K. E NEI, M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and g + c - content biases. *Mol. Biol. Evol.*, 9: 678-687.
- THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBONS, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weighting matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22: 4673-4680.
- WONG, L.H. E CHOO, K.H.A. 2001. Centromere on the move. *Genome Research* 11: 513-516.
- XIA, X. E XIE. Z., 2001 DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity*, 92: 371-373.

- YONENAGA-YASSUDA, Y. 1972. Polimorfismos cromossômicos em roedores brasileiros. São Paulo, 214p. Tese (Doutorado)- Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- YONENAGA-YASSUDA, Y.; Mori, L.; Chu, T.H.; 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.; RODRIGUES, M.T.; PELLEGRINO, K.C.M. 2005. Chromosomal banding patterns in the eyelid-less microteiid radiation: the $X_1X_2Y:X_1X_1X_2X_2$ sex chromosome system in *Calyptommatus*, and the karyotypes of *Psilophthalmus* and *Tretioscincus* (Squamata, Gymnophthalmidae). Genetics and Molecular Biology, 28(4): 700-709.

Descrição cariotípica de espécies pertencentes às tribos Heterodactylini e Iphisiini (Gymnophthalmidae, Squamata).

Abstract

Heterodactylini was first established in 2001 based on molecular data comprising five genera and eight species. Descriptions of new species and genera and frequent systematic review of the tribe resulted in a division into two tribes: Heterodactylini and Iphisiini. Of these tribes, only two species of Iphisiini were cytogenetically analyzed (*Iphisa elegans* and *Colobosaura modesta*). In this chapter, the purpose was to examine specimens of Heterodactylini and Iphisiini. As a result, the karyotypes of *Acratosaura mentalis*, *Alexandresaurus camacan* (Iphisiini), *Caparaonia itaquara*, *Colobodactylus taunayi*, *Heterodactylus imbricatus* and *Heterodactylus lundii* (Heterodactylini) were described. The diploid number found in all species was $2n = 42$ (18M +24 m), also found in the two previously analyzed species. The Ag-NORs were found in a pair of microchromosomes in all species. There seems to be a conservation of the diploid number and location of Ag-NORs in these two tribes, which constitutes an exception in microteiids, marked by an enormous karyotypic diversity among related genera or even within the same genus, as in the case of *Bachia*, *Leposoma* or *Placosoma*.

Resumo

A tribo Heterodactylini foi estabelecida pela primeira vez em 2001 com base em dados moleculares, sendo composta por cinco gêneros e oito espécies. A descrição de novas espécies e gêneros e a frequente revisão sistemática da tribo resultou em um desmembramento em duas tribos: Heterodactylini e Iphisiini. Dessas tribos, apenas duas espécies de Iphisiini foram analisadas citogeneticamente (*Iphisa elegans* e *Colobosaura modesta*). Neste capítulo, pretendeu-se analisar os exemplares das tribos Heterodactylini e Iphisiini. Como resultado, foram descritos os cariótipos das espécies *Acratosaura mentalis*, *Alexandresaurus camacan* (tribo Iphisiini), *Caparaonia itaquara*, *Colobodactylus taunayi*, *Heterodactylus imbricatus* e *Heterodactylus lundii* (tribo Heterodactylini). O número diplóide encontrado em todas as espécies foi de $2n = 42$ (18M+24m), o mesmo encontrado nas duas espécies já analisadas. As regiões organizadoras de nucléolo foram observadas em um par de microcromossomos em todas as espécies analisadas. Parece haver manutenção do número diplóide e da localização das Ag-RONs nestas duas tribos, o que constitui uma exceção dentro da família Gymnophthalmidae, marcada por uma enorme diversidade cariotípica entre gêneros relacionados ou até dentro de um mesmo gênero, como no caso de *Bachia*, *Leposoma* ou *Placosoma*.

Introdução

A família Gymnophthalmidae é composta por lagartos de pequeno porte reconhecido por apresentarem diversas adaptações ao hábito fossorial ou vida sob o folheto, sendo esses animais encontrados em diferentes biomas, como mata atlântica, caatingas, cerrado, florestas de altitude, entre outros. Essa família apresenta-se sistemática e taxonomicamente conflituosa, sendo alvo de inúmeras revisões, tanto com base em caracteres morfológicos, como genético-molecular.

Dentre os grandes clados recuperados para a família, destaca-se a tribo Heterodactylini (definida por Pellegrino e col., (2001) com base em evidências moleculares), que apresenta subdivisão em dois clados: um composto pelos gêneros *Colobodactylus* e *Heterodactylus* e o outro por *Iphisa* e *Colobosaura* (gênero merofilético) e recuperado como grupo irmão da tribo Gymnophthalmini.

Castoe e col. (2004) apresentam uma proposta filogenética em que a tribo Heterodactylini não é recuperada como monofilética. Os gêneros *Colobodactylus* e *Heterodactylus* compõem um clado com elevado suporte e os gêneros *Iphisa* e *Colobosaura* (também recuperado como merofilético em relação a *Iphisa*) formam um outro clado com elevado suporte mas que é recuperado como grupo irmão de Gymnophthalmini (*sensu* Pellegrino e col., 2001).

Devido ao seu merofiletismo, o gênero *Colobosaura* foi alvo de uma revisão taxonômica, realizada por Rodrigues e col. (2007), na qual os autores propuseram os gêneros *Alexandresaurus* e *Acratosaura* para realocar as espécies *Colobosaura* sp. e *Colobosaura mentalis*, respectivamente. A relação entre os Heterodactylini foi novamente analisada com base em dados morfológicos e moleculares (Rodrigues e col., 2007; Rodrigues e col., 2009) e os dois grandes clados bem suportados já observados foram recuperados: (1) *Heterodactylus*, *Colobodactylus* e *Caparaonia* e (2) *Acratosaura*, *Alexandresaurus*, *Colobosaura*, *Iphisa* e *Stenolepsis*. Essa tribo passou a ser composta por sete gêneros: *Colobodactylus*, *Colobosaura*, *Heterodactylus*, *Iphisa*, *Alexandresaurus*, *Acratosaura*, *Stenolepis* e *Caparaonia* e cerca de 13 espécies (Reptile Database).

A divisão nesses dois clados é também corroborada por caracteres morfológicos, como a expansão lateral dos ossos parietais e forma das escamas parietais (Rodrigues e col., 2007), sendo que o

clado composto pelos gêneros *Caparaonia*, *Colobodactylus* e *Heterodactylus* apresenta espécies com corpo mais alongado e redução de membros mais pronunciada do que os demais Heterodactylini (Rodrigues e col., 2009).

Devido aos altos valores de suporte dos dois clados que compõem Heterodactylini Rodrigues e col. (2009b) propõem a restrição de Heterodactylini aos gêneros *Heterodactylus*, *Colobodactylus* e *Caparaonia* e a criação de Iphisiini para acomodar os gêneros *Alexandresaurus*, *Acratosaura*, *Colobosaura*, *Iphisa* e *Stenolepis*.

Em termos citogenéticos, Gymnophthalmidae é marcada por uma elevada variação cromossômica, tanto em termos de número diplóide, fórmulas cariotípicas, presença de cromossomos supranumerários e sistemas cromossômicos de determinação sexual, sendo que a variação pode ser observada até mesmo em um único gênero (Pellegrino, 1998; Pellegrino e col., 1999a).

Das 13 espécies das tribos Iphisiini e Heterodactylini, somente duas, pertencentes à Iphisiini (*Iphisa elegans elegans* e *Colobosaura modesta*), foram analisadas citogeneticamente, apresentando $2n=42$ (18M+24m) e Ag-RONs em um par de microcromossomos (Pellegrino, 1998, Yonenaga-Yassuda, dados não publicados). Em *Colobosaura modesta*, todos os macrocromossomos apresentam dois braços e uma constrição secundária em um par de microcromossomos, que é o portador das Ag-RONs.

Dessa forma, com base na grande diversidade cromossômica de Gymnophthalmidae e nos poucos dados dessa natureza disponíveis para as tribos Heterodactylini e Iphisiini, este capítulo teve como objetivo analisar citogeneticamente exemplares de seis gêneros pertencentes a essas tribos, visando comparar os dados obtidos com os dados disponíveis para *Iphisa elegans* e *Colobosaura modesta* investigando se existem características que corroborem a separação desses gêneros em duas tribos.

Material e Métodos

Foram analisados citogeneticamente 20 exemplares das tribos Heterodactylini e Iphisiini (Tabela 5.1, Fig. 5.1), pertencendo às espécies *Alexandresaurus camacan*, *Acratosaura mentalis*, *Caparaonia itaiquara*, *Colobodactylus taunayi*, *Heterodactylus imbricatus* e *Heterodactylus lundii*. Os indivíduos foram coletados em diversas localidades durante viagens de campo e de levantamento faunístico pelo grupo do Professor Dr. Miguel Trefaut Rodrigues, do Departamento de Zoologia do IBUSP e as preparações foram realizadas em campo ou no Laboratório de Citogenética de Vertebrados, e após as preparações citogenéticas, os exemplares foram fixados e depositados no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo.

Preparações cromossômicas foram obtidas a partir da suspensão de fígado, intestino e testículos, de acordo com protocolo de Yonenaga (1972), Schmid (1978) e Eicher (1966), respectivamente, e os cromossomos foram analisados após coloração convencional, coloração pelo nitrato de prata identificando as regiões organizadoras de nucléolo (Ag-RONs) seguindo técnicas de rotina (Howell e Black, 1980) e FISH utilizando sonda telomérica, segundo especificações do fabricante (DAKO). As metáfases foram fotografadas em microscópio da marca Zeiss em objetiva 100 de imersão com filtro verde, usando filme Kodak Imagelink HQ ASA 64 e registradas com auxílio do sistema de captura de imagem Ikaros & Isis v.5 (Metasystems, 2004) e os cariótipos foram montados com o auxílio do Photoshop CS3 levando-se em conta a morfologia, o tamanho e a posição centromérica dos cromossomos, dispostos em ordem decrescente de tamanho.

Tabela 5.1 – Relação de espécies, número de tombo do Laboratório de Citogenética de Vertebrados dos exemplares, sexo e localidade dos animais analisados citogeneticamente.

Espécie	Exemplar	Sexo	Localidade
<i>Acratosaura mentalis</i>	LG 2433	M	Guinda, Diamantina - MG
	LG 2464	F	Parque Nacional do Peruaçu - MG
	LG 2590	F	
	LG 2558	M	Mata Escura, Jequitinhonha - MG
<i>Alexandresaurus camacan</i>	LG 2379	F	Trancoso – BA
<i>Caparaonia itaiquara</i>	LG 2256	M	P. N. Caparaó – MG
	LG 2174	F	
	LG 2175	F	
	LG 2176	F	
<i>Colobodactylus taunayi</i>	LG 1121	M	Cananéia – SP
	LG 1236	F	
	LG 2090	M	
	LG 1397	?	Ribeirão Grande - SP
	LG 1673	M	Serra da Cantareira - SP
	LG 2083	F	Buri – SP
	LG 2271	F	
	LG 2108	M	Wenceslau-Brás - PR
<i>Heterodactylus imbricatus</i>	LG 1512	M	Serra da Cantareira – SP
	LG 2109	F	Poços de Caldas – MG
<i>Heterodactylus lundii</i>	LG 2435	F	Parque Nacional da Serra do Cipó – MG

Heterodactylus lundii

Heterodactylus imbricatus

Caparaonia itaquara

Colobodactylus tunayi

Alexandresaurus camacan

Acratosaura mentalis

Figura 5.1. Representantes das espécies pertencentes à tribo Heterodactylini (*Heterodactylus imbricatus*, *Heterodactylus lundii*, *Colobodactylus taunayi* e *Caparaonia itaquara*) e à tribo Iphisiini (*Acratosaura mentalis* e *Alexandresaurus camacan*) analisadas citogeneticamente.

Resultados

Embora escassos e de difícil obtenção, os resultados sugerem que todas as espécies apresentem um cariótipo de $2n = 42$, composto por nove pares de macrocromossomos e 12 pares de microcromossomos.

Nas espécies *Acratosaura mentalis* (Fig. 5.2), *Alexandresaurus camacan* (Fig. 5.3), *Colobodactylus taunayi* (Fig. 5.4), *Heterodactylus imbricatus* (Fig. 5.5) e *Heterodactylus lundii* (Fig. 5.6) e *Caparaonia itaquara* (Fig. 5.7), todos os macrocromossomos apresentaram morfologia meta/submetacêntrica. Já em *Caparaonia itaquara* e *Heterodactylus lundii* também apresentaram um par cromossômico de morfologia subtelo/acrocêntrica (par 7). Nas seis espécies as preparações não permitiram a identificação da morfologia de todos os microcromossomos, entretanto é possível observar alguns microcromossomos portadores de dois braços em todas as espécies. *Acratosaura mentalis* apresentou metáfases com cromossomos bastante distendidos sendo possível observar uma constrição secundária no braço curto de um par de microcromossomos (Fig. 5.2, em destaque).

A coloração por nitrato de prata revelou um par de Ag-RONs localizadas no braço curto de um par de microcromossomos subtelocêntricos, possivelmente o par 10, em *Alexandresaurus camacan* (Fig. 5.3, em destaque), na região de constrição secundária em *Caparaonia itaquara* que apresenta Ag-RONs intersticiais (Fig. 5.7, em destaque), no braço curto de um par de microcromossomos acrocêntricos, aparentemente o par 10, em *Colobodactylus taunayi* (Fig. 5.4, em destaque) e em um par de microcromossomos de morfologia não definida em *Heterodactylus imbricatus* (Fig. 5.5, em destaque). Em *Acratosaura mentalis*, as Ag-RONs são intersticiais e localizam-se na constrição secundária do braço curto de um par de microcromossomos (Fig. 5.2, em destaque).

A técnica de FISH com sonda telomérica foi realizada para as espécies *Alexandresaurus camacan* e *Caparaonia itaquara* para investigar a possível ocorrência de rearranjos, uma vez que *Caparaonia* apresenta um par de macrocromossomos acrocêntrico em oposição às demais espécies, que apresentaram todos os macrocromossomos de dois braços. Infelizmente não foi possível utilizar uma espécie da tribo Heterodactylini para comparar com *Caparaonia*, sendo utilizada a espécie

Alexandresaurus camacan. A técnica de FISH com sonda telomérica evidenciou marcações somente nas regiões terminais em *Alexandresaurus camacan*, entretanto, em *Caparaonia itaquara* as marcações foram encontradas em todas as regiões teloméricas e na região pericentromérica de todos os macrocromossomos (Fig. 5.8 a,b). Vale ressaltar que as marcações nos microcromossomos são conspícuas embora estes cromossomos apresentem tamanho reduzido.

Figura 5.2. Cariótipo de exemplar fêmea de *Acratosaura mentalis*, com $2n=42$ (18M+24m). No retângulo em destaque, o par de microcromossomos portador das Ag-RONs em coloração convencional evidenciando as constrições secundárias (esquerda) e após coloração por nitrato de prata evidenciando as marcações na região distal do braço curto, na constrição secundária.

Figura 5.3. Cariótipo de exemplar fêmea de *Alexandresaurus camacan*, com $2n=42$ (18M+24m). No retângulo em destaque, o par de microcromossomo portador das Ag-RONs.

Figura 5.4. Metáfase de *Colobodactylus taunayi*, macho, em coloração convencional, com número diplóide igual a 42 (18M+24m), à esquerda. À direita, metáfase em que foi realizada a técnica de Ag-RONs. Setas indicam o par portador das Ag-RONs em coloração convencional e o mesmo par corado com nitrato de prata em destaque

Figura 5.5. Cariótipo de *Heterodactylus imbricatus*, macho, em coloração convencional, com número diplóide igual a 42 (18M+24m). No retângulo em destaque o par portador das Ag-RONs.

Figura 5.6. Cariótipo de exemplar fêmea de *Heterodactylus lundii*, com $2n = 41$ (18M+23m). Neste cariótipo, é possível notar a falta de um dos microcromossomos do par 10.

Figura 5.7. Cariótipo de *Caparaonia itaiquara*, macho, em coloração convencional, com número diplóide igual a 42 (18M+24m). No retângulo em destaque o par portador das Ag-RONs.

Figura 5.8. Metáfase de *Caparaonia itaiquara* (a) e *Alexandresaurus camacan* (b) após a técnica de FISH com sonda telomérica. Em (a) é possível observar as marcações pericentroméricas em todos os macrocromossomos (a seta em verde evidencia o cromossomo acrocêntrico), enquanto em (b) só observam-se as marcações terminais.

Discussão

Apresentando-se como uma exceção dentro da família Gymnophthalmidae, as tribos Heterodactylini e Iphisiini apresentaram um inesperado conservadorismo no número diplóide e fórmula cariotípica com as seis espécies descritas apresentando 42 cromossomos, separados em nove pares de macrocromossomos e 12 pares de microcromossomos. Esse número diplóide também foi relatado para outras duas espécies da tribo já descritas na literatura: *Colobosaura modesta* e *Iphisa elegans* (Pellegrino, 1998; Pellegrino e col., 2001; Yonenaga-Yassuda (dados não publicados)).

Os dados citogenéticos disponíveis permitem a comparação das espécies descritas no presente capítulo com *Colobosaura modesta* (Pellegrino, 1998). *Colobosaura modesta* apresentou os nove pares de macrocromossomos metacêntricos e submetacêntricos, o par 10 (primeiro par de microcromossomo) com constrição secundária no braço curto e essa constrição mostrou-se Ag-RON positiva, com heteromorfismo quanto ao tamanho das RONS em 23% das metáfases analisadas e quanto ao número (algumas metáfases apresentaram somente um dos homólogos marcados).

Comparando esse dados com os obtidos para outros representantes da tribo Iphisiini, *Alexandresaurus camacan* apresentou a Ag-RON no mesmo par cromossômico, não sendo visualizada a constrição secundária ou o heteromorfismo presentes em *Colobosaura*. Já em *Acratosaura mentalis*, também foi observada constrição secundária no maior par de microcromossomos, possivelmente ocorrendo no mesmo par presente em *Colobosaura modesta*, que também é portador das Ag-RONS.

Com relação a Heterodactylini, as espécies descritas também apresentaram RONS no maior par de microcromossomos em *Caparaonia* e *Colobodactylus*. *Heterodactylus imbricatus* apresentou RONS aparentemente heteromórficas, entretanto não foi possível identificar o par portador da RON ou fazer uma análise estatística para comprovar este possível heteromorfismo.

As constrições secundárias presentes em microcromossomos são difíceis de serem detectadas. Embora em *Acratosaura mentalis* tenha sido possível observá-las, não foram visualizadas em todas as metáfases. Dessa forma, o fato de não terem sido encontradas constrições secundárias nas outras espécies de Iphisiini ou Heterodactylini pode ser simplesmente porque as preparações não apresentaram condensação adequada para permitir a visualização dessas estruturas ou pela qualidade dos cromossomos obtidos e não por estarem ausentes nas outras espécies. Além disso, um número reduzido de metáfases foi analisado, o que reduz as chances dessas estruturas serem detectadas.

Aparentemente, a maioria das espécies aqui analisadas compartilham o mesmo par cromossômico nucleolar (maior par de microcromossomos), e o número e posição das RONS parece conservado entre os representantes das duas tribos. Entretanto, a análise de outros exemplares e a aplicação de técnicas mais refinadas (como FISH com sonda ribossomal) permitirão uma melhor comparação entre as espécies e confirmação dessa proposta.

As marcações obtidas por hibridação por sonda telomérica em *Alexandresaurus camacan* constituem o padrão esperado após a realização de FISH com sondas teloméricas, entretanto, as marcações nas regiões pericentroméricas dos macrocromossomos que possuem dois braços de *Caparaonia itaiquara* podem ser resquícios de sequências teloméricas intersticiais, sugerindo rearranjos cromossômicos Robertsonianos, ou, mais provavelmente, que as marcações devem estar relacionados às sequências repetitivas semelhantes às sequências (TTAGGG)_n ou às regiões de heterocromatina constitutiva (Meyne e col., 1990). Tornam-se importantes, dessa forma, a obtenção dos padrões de heterocromatina constitutiva para investigar a origem das marcações intersticiais em *Caparaonia* e se representam indícios de rearranjos envolvendo os macrocromossomos das duas tribos e a aplicação da FISH com sonda telomérica em outros representantes para verificar se essas marcações pericentroméricas são características de *Caparaonia itaiquara*.

A constituição cromossômica das seis espécies analisadas apresentou características bastante similares como número diplóide, fórmula cariotípica e localização das Ag-RONs em um par de microcromossomos, sendo este o par 10 em quatro das cinco espécies em que essa técnica forneceu resultados. Com exceção de *Caparaonia itaiquara* e *Heterodactylus lundi* que apresentaram um par acrocêntrico, não foram obtidos outros caracteres espécie específicos ou que permitissem a caracterização das espécies e a divisão em duas tribos. No entanto, técnicas citogenéticas mais resolutivas como os padrões de bandamento C (que não apresentam dados até o momento, mas que em alguns casos mostraram-se informativos - Yonenaga-Yassuda e col., 1996), bandamento longitudinais e pintura devem receber investimento para verificar a possível existência de marcadores citogenéticos que reforcem a existência das tribos Heterodactylini e Iphisiini, bem como permitir um melhor entendimento da dinâmica da evolução cromossômica no grupo.

Referencias bibliográficas

- CASTOE, T.A.; DOAN, T.M.; PARKINSON, C.L. 2004. Data partitions and complex models in Bayesian analysis: the phylogeny of Gymnophthalmidae lizards. *Systematic Biology*, 53(3): 448-469.
- EICHER, E. 1966. An improved air-drying technique for recovery of all stages of meiosis in the mammalian testis.- *Mamml. chrom. Newsl.* 20: 74.
- HOWELL, W.M. E BLACK, D.A. 1980. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36: 1014-1015.
- 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.; MOYZIS, R.K. 1990. Distribution of non-telomeric sites of (TTAGGG)_n telomeric sequence in vertebrate chromosomes. *Chromosoma* 99: 3-10.
- 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). 127p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- PELLEGRINO, K.C.M.; RODRIGUES, M.T.; YONENAGA- YASSUDA, Y.; SITES, J.W. 2001. A molecular perspective on the evolution of microteiid lizards (Squamata, Gymnophthalmidae), and a new classification for the family. *Biological Journal of Linnean Society*, 74: 317–340.
- PELLEGRINO, K.C.M.; RODRIGUES, M.T.; 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(1): 15-21.
- REPTILE DATABASE, acessado em 16 de março, disponível no endereço eletrônico <http://reptile-database.reptarium.cz/search.php>
- RODRIGUES, M.T; PELLEGRINO, K.C.M.; DIXO, M.; VERDADE, V.K.; PAVAN, D.; ARGOLO, A.J.S.; SITES, J.W. 2007. A new genus of microteiid lizard from the Atlantic forests of state of Bahia, Brazil, with a new generic name for *Colobosaura mentalis*, and a discussion of relationships among the Heterodactylini (Squamata, Gymnophthalmidae). *Am. Mus. Novitates*, 3565: 1-27.
- RODRIGUES, M.T.; CASSIMIRO, J.; PAVAN, D.; CURCIO, F.F.; VERDADE, V.K.; PELLEGRINO, K.C.M. 2009. A new genus of microteiid lizard from the Caparaó mountains, Southeastern Brazil, with a discussion of relationships among Gymnophthalminae (Squamata). *American Museum Novitates*, 3673: 1-27.

- SCHMID, M. 1978. Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma*, 66: 361-388.
- YONENAGA, Y. 1972. Polimorfismos cromossômicos em roedores brasileiros. São Paulo, 214p. Tese (Doutorado)- Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- YONENAGA-YASSUDA, Y.; MORI, L.; CHU, T.H.; RODRIGUES, M.T. 1996. Chromosomal banding patterns in the eyelid-less microteiid radiation: *Procellosaurinus* and *Vanzosaura* (Squamata, Gymnophthalmidae). *Cytogenet. Cell Genet.*, 74: 203-210.

Considerações Finais

Considerações finais

- A descrição do cariótipo com $2n = 44$ (20M+24m) para exemplares de *Leposoma percarinatum* da Estação Ecológica de Anavilhanas (Amazonas) corrobora a hipótese de Pellegrino e col. (2003) de que a forma triplóide encontrada em Vila Rica (Mato Grosso) poderia ter se originado a partir de um evento de hibridação entre uma forma diplóide de *Leposoma percarinatum* não conhecida naquele momento (cujos gametas não sofreriam redução em número) e uma espécie bissexual próxima ($n=22$, 10M+12m).
- Com a descrição do cariótipo com $2n = 44$ (20M+24m) para *Leposoma percarinatum* e *Leposoma ferreirai* (grupo *parietale*) e indícios de que a espécie *Leposoma nanodactylus* apresenta um cariótipo bastante similar à *Leposoma scincoides*, que apresenta $2n = 52$ (grupo *scincoides*), novas evidências contribuem para a suposição de que há uma diferenciação cariotípica associada à distribuição disjunta dos dois grupos dentro do gênero *Leposoma* e de que os dois grupos constituem grupos monofiléticos, como sugerido também por Ruibal (1952) com base em similaridade morfológica, dados moleculares (Pellegrino e col., submetido).
- As análises preliminares de *Leposoma annectans* mostram que essa espécie pode apresentar um cariótipo distinto dos cariótipos encontrados para os grupos *scincoides* (ao qual pertence) e *parietale*, sendo que novos estudos deverão ser conduzidos nesta espécie para verificar se ela consiste em uma espécie mais derivada e com cariótipo rearranjado dentro do gênero.
- Para *Dryadosaura nordestina* foi estabelecido o cariótipo com número diplóide de $2n= 48$ (20M+28m), sendo uma das seis espécies de microteideos que apresenta número de microcromossomos diferente de 24. Além disso, o cariótipo de *Dryadosaura* é bastante diferente do encontrado para *Anotosaura vanzolinia*, corroborando os dados morfológicos e moleculares de que se trata de um novo gênero.
- Os dados cariotípicos descritos no presente trabalho contribuem para reforçar a diversidade cariotípica elevada na família, com descrição dos cariótipos de *Scriptosaura catimbau* ($2n=48$) e

Dryadosaura nordestina ($2n=48$, 20M+28m), que apresentam número diplóide e fórmula cariotípica inéditos para microteídeos. No entanto, as tribos Heterodactylini e Iphisiini constituem uma exceção dentro dessa família por apresentarem um alto grau de conservadorismo cromossômico, tanto com relação ao número diploide ($2n=42$ 18M+24m), como a morfologia cromossômica.

- A descrição de *Colobosauroides carvalhoi*, *Leposoma ferreirai* e *Leposoma percarinatum* com $2n= 44$ (20M+24m) eleva para 17 o número de espécies (pertencente às tribos Cercosaurini, Ecleopodini e Gymnophthalmini, *sensu* Pellegrino e col., 2001) que apresentam esse número diplóide e fórmula cariotípica e o número diplóide de $2n= 42$ (18M+24m) descrito para as espécies das tribos Heterodactylini e Iphisiini passa a ser reconhecido em 11 espécies, das tribos Cercosaurini, Gymnophthalmini, Heterodactylini e Iphisiini, no entanto com as informações disponíveis até o momento não é possível sugerir se uma dessas duas formas constituiria o cariótipo ancestral da família e quais os rearranjos envolvidos na diversificação dos cariótipos nas espécies restantes de microteídeos.

- Embora apresentem o mesmo número diplóide, algumas diferenças cariotípicas são visíveis nas espécies das tribos Heterodactylini, como a presença de Ag-RONs intersticiais em constrições secundárias nas espécies *Caparaonia itaquara* e *Acratosaura mentalis* e de um par subtelo/acrocêntrico (par 7) nas espécies *Caparaonia itaquara* e *Heterodactylus lundii*. Entretanto, não foi possível estabelecer características cromossômicas que apoiasse a divisão em duas tribos, evidenciada por dados moleculares.

- A reconstrução filogenética da tribo Ecleopodini recupera o monofiletismo da tribo e do clado composto pelos gêneros *Anotosaura*, *Dryadosaura* e *Colobosauroides*, sendo que as relações entre os demais gêneros não puderam ser estabelecidas. Altos valores de distância genética foram observados para todos os marcadores entre todos os gêneros, podendo indicar uma divergência rápida e simultânea na tribo, que dificultaria o estabelecimento das relações filogenéticas nesse grupo. Novos estudos deverão ser realizados na tribo, aumentando o número de genes, amostragem das espécies dentro da tribo e inclusão de novos grupos externos na tentativa de obter uma melhor resolução filogenética.

- A espécie *Scriptosaura catimbau* recentemente descrita (Rodrigues e Santos, 2008) era o único gênero que faltava ser analisado citogeneticamente na tribo Gymnophthalmini e apresentou um cariótipo único com $2n = 48$, com quatro pares submeta/metacêntricos, com marcações teloméricas intersticiais, e os demais com redução gradual de tamanho, sugerindo que rearranjos Robertsonianos devam estar envolvidos na evolução cariotípica da tribo Gymnophthalmini. Os dados morfológicos (Rodrigues e Santos, 2008) sugerem que o gênero mais próximo deveria ser *Calyptommatus*, entretanto, as análises filogenéticas recuperaram *Scriptosaura* como grupo irmão de *Nothobachia ablephara*, embora esses gêneros estejam intimamente relacionados com *Calyptommatus*.

Anexo 1

Anexo 1: Revisão cariotípica das espécies de Gymnophthalmidae com descrição do número diplóide (2n), se apresentam cromossomos sexuais (Crom. sexuais) e cromossomos supernumerários (Crom. B), qual (is) par(es) apresentam as Ag-RONs (RON), e se foi realizado o bandamento C (BC), bandamento R (BR) e hibridação *in situ* com sonda telomérica (FISH).

Subfamília Gymnophthalminae

Tribo Heterodactylini	2n	Crom. sexuais	Crom. B	RON	BC	BR	FISH	Referência
<i>Caparaonia itaiquara</i>	42 (18M+24m)			par 10			+	presente estudo
<i>Colobodactylus taunayi</i>	42 (18M+24m)			par 10				presente estudo
<i>Heterodactylus imbricatus</i>	42 (18M+24m)			um par micro				presente estudo
<i>Heterodactylus lundii</i>	42 (18M+24m)							presente estudo
Tribo Iphisiini	2n	Crom. sexuais	Crom, B	RON	BC	BR	FISH	Referência
<i>Acratosaura mentalis</i>	42 (18M+24m)							presente estudo
<i>Alexandresaurus camacan</i>	42 (18M+24m)			par 10			+	presente estudo
<i>Colobosaura modesta</i>	42 (18M+24m)			par 10 (Rr)	+	+		Pellegrino, 1998, Pellegrino e col., 2001
<i>Iphisa elegans elegans</i>	42 (18M+24m)							Pellegrino e col., 2001
Tribo Gymnophthalmini	2n	Crom. sexuais	Crom, B	RON	BC	BR	FISH	Referência
<i>Calyptommatus leiolepis</i>	57♂,58♀	X ₁ X ₁ Y: X ₁ X ₁ X ₂ X ₂		par 27	+	+	+	Yonenaga-Yassuda, 1992; Yonenaga-Yassuda e col., 1996a, 2005
<i>Calyptommatus nicterus</i>	57♂,58♀	X ₁ X ₁ Y: X ₁ X ₁ X ₂ X ₂		par 27	+	+		Yonenaga-Yassuda, 1992; Yonenaga-Yassuda e col., 1996a, 2005
<i>Calyptommatus sinebrachiatus</i>	57♂,58♀	X ₁ X ₁ Y: X ₁ X ₁ X ₂ X ₂		par 27	+	+		Yonenaga-Yassuda, 1992; Yonenaga-Yassuda e col., 1996a, 2005
<i>Gymnophthalmus leucomystax</i>	44 (20M+24m)			2 a 7 marcações	+	+		Yonenaga-Yassuda e col.,1995
<i>Gymnophthalmus cryptus</i>	44 (20M+24m)							Cole e col., 1993
<i>Gymnophthalmus plei</i>	34 (12M+22m)	XX:XY						Cole e col., 1990
<i>Gymnophthalmus speciosus</i>	44 (20M+24m)							Cole e col., 1990

Tribo Gymnophthalmini	2n	Crom. sexuais	Crom, B	RON	BC	BR	FISH	Referência
<i>Gymnophthalmus vanzoi</i>	44 (20M+24m)			1 a 6 marcações	+	+		Yonenaga-Yassuda e col., 1995
* <i>Gymnophthalmus underwoodi</i>	44 (20M+24m)			um par macro	+	+		Cole et al, 1990; Yonenaga-Yassuda e col., 1995
<i>Micrablepharus maximiliani</i>	50 -51	XX:XY	1B	2 a 6 marcações	+	+		Yonenaga-Yassuda e col., 1996 b, Yonenaga-Yassuda e Rodrigues, 1999
<i>Micrablepharus atticolus</i>	50-53	XX:XY	2-3 B	2 a 7 marcações	+	+		Yonenaga-Yassuda e col., 1996 b, Yonenaga-Yassuda e Rodrigues, 1999
<i>Nothobachia ablephara</i>	62 - 64	XX:XY	1-2 B	2 a 7 marcações	+	+	+	Pellegrino e col., 1999b
<i>Procellosaurinus erythrocerus</i>	40 (16M+24m)			um par micro	+	+		Yonenaga-Yassuda e col.,1996
<i>Procellosaurinus tetradactylus</i>	40 (16M+24m)			um par micro	+			Yonenaga-Yassuda e col., 1996
<i>Psilophthalmus paeminus</i>	44 (20M+24m)			um par micro	+	+		Yonenaga-Yassuda, 1992; Yonenaga-Yassuda e col., 2005
<i>Scriptosaura catimbau</i>	48			um par acrocêntrico	+	+	+	presente estudo
<i>Tretioscincus agilis</i>	42 (18M+24m)			um par micro				Yonenaga-Yassuda e col., 2005
<i>Tretioscincus oriximinensis</i>	42 (18M+24m)				+	+		Yonenaga-Yassuda e col., 2005
<i>Vanzosaura rubricauda</i>	40 (16M+24m)			par 6 e micro	+	+		Yonenaga-Yassuda e col., 1996

Subfamília Cercosaurinae

Tribo Cercosaurini	2n	Crom. sexuais	Crom, B	RON	BC	BR	FISH	Referência
<i>Anadia bitaeniata</i>	46 (20M+26m)	XX♀:XY♂						Gorman, 1970
<i>Bachia dorbignyi</i>	32 (18M+14m)							Pellegrino, 1998, Pellegrino e col., 2001
<i>Bachia bresslaui</i>	46 (18M+28m)							Pellegrino, 1998, Pellegrino e col., 2001
<i>Cercosaura ocellata</i>	42 (18M+24m)			2 a 6 marcações	+	+		Pellegrino, 1998, Pellegrino e col., 2001
<i>Neusticurus bicarinatus</i>	44 (20M+24m)			4 ou 5 marcações	+	+		Pellegrino, 1998, Pellegrino e col., 2001
<i>Neusticurus ecpleopus</i>	44 (20M+24m)			um par macro	+			Pellegrino, 1998, Pellegrino e col., 2001
<i>Neusticurus strangulatus</i>	44 (20M+24m)							Sherbrooke e Cole, 1972
<i>trachodus</i>	44 (20M+24m)							Sherbrooke e Cole, 1972
<i>Pantodactylus schreibersii</i>	44 (20M+24m)							Pellegrino, 1998, Pellegrino e col., 2001
<i>albostrigatus</i>	44 (20M+24m)							Pellegrino, 1998, Pellegrino e col., 2001
<i>Placosoma cordylinum</i>	44 (20M+24m)							Pellegrino, 1998, Pellegrino e col., 2001
<i>Placosoma glabellum</i>	58							Pellegrino, 1998, Pellegrino e col., 2001
<i>Pholidobolus montium</i>	46 (20M+26m)			um par macro	+			Gorman, 1970, Yonenaga-Yassuda e col., 1996

Tribo Ecpleopodini	2n	Crom. sexuais	Crom, B	RON	BC	BR	FISH	Referência
<i>Anotosaura vanzolinia</i>	46 (22M+24m)			um par micro	+	+		Pellegrino, 1998, Pellegrino e col., 2001
<i>Colobosauroides cearensis</i>	44 (20M+24m)							Pellegrino e col., 2001
<i>Colobosauroides carvalhoi</i>	44 (20M+24m)			um par micro				presente estudo
<i>Dryadosaura nordestina</i>	48 (20M+28m)							presente estudo
<i>Leposoma guianense</i>	44 (20M+24m)			um par micro	+	+	+	Pellegrino e col., 1999a
<i>Leposoma osvaldoi</i>	44 (20M+24m)			um par macro	+	+	+	Pellegrino e col., 1999a
* <i>Leposoma percarinatum</i>	66 (30M+36m)							Pellegrino e col., 2003
	44 (20M+24m)			um par micro (Rr)	+			Laguna e col., 2010
<i>Leposoma ferreirai</i>	44 (20M+24m)			um par micro	+			Laguna e col., 2010
<i>Leposoma scincoides</i>	52			par 19	+	+	+	Pellegrino e col., 1999a

M= macrocromosomos

m=microcromossomos

* espécies partenogenéticas

Anexo 2

Karyotypes of a Cryptic Diploid Form of the Unisexual *Leposoma percarinatum* (Squamata, Gymnophthalmidae) and the Bisexual *Leposoma ferreirai* from the Lower Rio Negro, Amazonian Brazil

MARCIA M. LAGUNA,¹ MIGUEL T. RODRIGUES,² RODRIGO M. L. DOS SANTOS,¹ YATIYO YONENAGA-YASSUDA,¹
 TERESA C. S. ÁVILA-PIRES,³ MARINUS S. HOOGMOED,³ AND KATIA C. M. PELLEGRINO^{1,4}

¹Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Rua do Matão, 277, São Paulo, São Paulo, CEP 05508-090, Brazil

²Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Rua do Matão, Travessa 14, n° 101, São Paulo, São Paulo, CEP 05508-090, Brazil

³Museu Paraense Emílio Goeldi/CZO, Caixa Postal 399, CEP 66017-970 Belém, Pará, Brazil

⁴Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Paulo, Campus Diadema. Avenida, Professor Artur Riedel, 275 Diadema, São Paulo, CEP 09972-270, Brazil

ABSTRACT.—Karyotypes of *Leposoma* show a clear differentiation between species of the *scincoides* group from Brazilian Atlantic Forest ($2n = 52$, without distinctive size groups of chromosomes) and those of the *parietale* group from the Amazon ($2n = 44$, with $20M + 24m$). In a previous study, we found that in the *parietale* group the parthenoform *Leposoma percarinatum* from the state of Mato Grosso, Brazil, exhibited a triploid karyotype ($3n = 66$) with 30 macrochromosomes and 36 microchromosomes. It was suggested that this karyotype arose after hybridization between a bisexual species with $N = 22$ ($10M + 12m$) and a hypothetical unisexual cryptic diploid form of the *L. percarinatum* complex. Herein, we describe the karyotypes for two species of the *parietale* group occurring sympatrically in the Arquipélago das Anavilhanas, lower Rio Negro, in Amazonian Brazil. The first represents a distinctive diploid parthenogenetic clone of the *L. percarinatum* complex, and the other is the recently described *Leposoma ferreirai*. Both species have 44 banded chromosomes clearly represented by 20 macrochromosomes and 24 microchromosomes and present Ag-NORs in one pair of the smallest sized microchromosomes; heteromorphism of size for these regions was detected in *L. percarinatum*. C-banding revealed blocks of constitutive heterochromatin on the telomeric and pericentromeric regions of macrochromosomes and some microchromosomes. The description of a diploid karyotype ($2n = 44$, $20M + 24m$) for the *L. percarinatum* complex and its sympatric congener *L. ferreirai* provides new insight for a better understanding of the origin of parthenogenesis in the *L. percarinatum* complex.

Gymnophthalmidae is a very diverse monophyletic assemblage of exclusively Neotropical lizards that currently encompasses about 180 species and 44 recognized genera (Rodrigues et al., 2009; Kok, 2009). Cytogenetically, it is still a poorly known family with data restricted to 40 species assigned to 20 genera (for an overview see Pellegrino et al., 2001; Yonenaga-Yassuda et al., 2005). Although only a few species have been analyzed thus far, a conspicuous karyotypic diversity has been found in the family. Karyotypes show diploid numbers ranging from $2n = 32$ ($14M + 18m$) in *Bachia dorbignyi* to $2n = 62$ – 64 in *Nothobachia ablephara* (Pellegrino et al., 1999b, 2001), heteromorphic sex chromosomes (including multiple mechanisms of sex determination), supernumerary chromosomes, and two parthenogenetic species in the genera *Gymnophthalmus* and *Leposoma* (for examples see Cole et al., 1990; Yonenaga-Yassuda and Rodrigues, 1999; Pellegrino et al., 2001; Yonenaga-Yassuda et al., 2005).

Despite the relatively small body size (snout–vent length less than 50 mm) of the gymnophthalmid lizards of the genus *Leposoma*, they represent a conspicuous component of the leaf litter of tropical rain forests from Costa Rica throughout the Amazon to the Atlantic slopes of eastern Brazil (Rodrigues,

1997; Rodrigues and Borges, 1997; Rodrigues et al., 2002; Rodrigues and Ávila-Pires, 2005). Traditionally, species of *Leposoma* have been assembled into two groups on the basis of morphological similarity (Ruibal, 1952): *parietale* and *scincoides*. The *parietale* group presently includes 10 bisexual species (*Leposoma parietale*, *Leposoma hexalepis*, *Leposoma ionna*, *Leposoma rugiceps*, *Leposoma southi*, *Leposoma snethlagae*, *Leposoma osvaldoi*, *Leposoma guianense*, and the recently described *Leposoma caparensis* and *Leposoma ferreirai*; Esqueda, 2005; Rodrigues and Ávila-Pires, 2005) and one parthenogenetic species (*Leposoma percarinatum*) and ranges throughout the Amazon to Costa Rica (Uzzell and Barry, 1971; Rodrigues and Ávila-Pires, 2005). The *scincoides* group has five formally recognized species (*Leposoma scincoides*, *Leposoma annectans*, *Leposoma nanodactylus*, *Leposoma puk*, and *Leposoma baturitensis*) that, except for *L. baturitensis* that is endemic to the relic forest in the Caatingas of state of Ceará, are all restricted to the Atlantic forest of eastern Brazil (Rodrigues, 1997; Rodrigues and Borges, 1997; Rodrigues et al., 2002).

The first cytogenetic report on *Leposoma* included data for two species of the *parietale* group (*L. osvaldoi* and *L. guianense*; $2n = 44$, $20M + 24m$) and one of the *scincoides* group (*L. scincoides*, $2n = 52$) (Pellegrino et al., 1999a). After conventional staining, the karyotype of *L. scincoides* with 52 acrocentric/subtelocentric chromosomes of decreasing size was easily distin-

⁴Corresponding Author. E-mail: katia.pellegrino@unifesp.br

TABLE 1. Specimen identification (ID), number of metaphases with $2n = 44$ of the total metaphases analyzed in conventional staining (CS) and the number of cells after Ag-NOR staining in two species of *Leposoma*. The percentage (%) of heteromorphic NORs (Rr) and homomorphic NORs (rr) is presented.

Species	ID	CS	Total Ag-NOR	Rr (%)	rr (%)
<i>Leposoma percarinatum</i> ($2n = 44$, 20M + 24m)	MTR 9939	12/57	22	19 (86,4)	3 (13,6)
	MTR 9940	13/52	10	9 (90)	1 (10)
	MTR 9941	18/68	14	13 (92,9)	1 (7,1)
<i>Leposoma ferreirai</i> ($2n = 44$, 20M + 24m)	MTR 9948	3/40	9	1 (11,1)	8 (88,9)
	MTR 9949	26/87	6	0 (0)	6 (100)
	MTR 9950	4/33	4	0 (0)	4 (100)

guishable from those found in species of the *parietale* group with $2n = 44$ represented by 10 pairs of macrochromosomes and 12 pairs of microchromosomes, most of them biarmed. That study revealed a conspicuous karyotypic differentiation between both groups of *Leposoma*, coincident with their strict association with the two different regions of tropical rainforest. Later, Pellegrino et al. (2003) described a triploid karyotype with $3n = 66$ (30M + 36m) for three females of the parthenoform *L. percarinatum* from Vila Rica, state of Mato Grosso, Brazil, and hypothesized that the triploid karyotype was the result of a hybridization event between a bisexual species with a *L. guianense*/*osvaldoi*-like karyotype ($N = 22$, 10M + 12m) and an as-yet undiscovered unisexual diploid cryptic form of the *L. percarinatum* complex. Uzzell and Barry (1971) had already suggested that parthenogenesis in the genus probably originated through hybridization between closely related species, and based on geographic distribution, they suggested *L. guianense* and *L. parietale* as putative candidates for the parental species of *L. percarinatum*.

A field survey conducted in 2005 in the Arquipélago das Anavilhanas, state of Amazonas, in the lower Rio Negro (Brazil), revealed the occurrence of three sympatric (but apparently not syntopic) species of the *parietale* group in that locality: *L. percarinatum*, *L. guianense*, and a recently described bisexual species (*L. ferreirai*), that was suggested to be a possible parental species of the unisexual *L. percarinatum* (Rodrigues and Ávila-Pires, 2005). According to those authors, one possible origin for the diploid form of the *L. percarinatum* complex could be the hybridization between *L. guianense* and *L. ferreirai*, whereas the triploid form found in Mato Grosso (Pellegrino et al., 2003) would represent a further hybridization of this unisexual diploid form and *L. osvaldoi*, because *L. guianense* does not occurs that far south.

Of the three species found in the Anavilhanas area, we obtained chromosomal data for *L. percarinatum* and *L. ferreirai*. The new information, supplemented by additional chromosomal data on *Leposoma* species reported herein, provides new evidence concerning the origin of parthenogenesis in the genus.

MATERIALS AND METHODS

Three females of *L. percarinatum* (MTR 9939, 9940, 9941), collected at the Terra Firme station, Estação Ecológica de Anavilhanas, left bank of Rio Negro (02°29'19"S, 60°52'35"W), and two females and one male of *L. ferreirai* (MTR 9948, 9949, 9950) from Ilha do

Açaí, Rio Negro (02°38'42.4"S, 60°45'49.5"W), both localities in state of Amazonas, Brazil, received provisional ID numbers (MTR). Specimens were deposited at the Herpetological collection at Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo (MZUSP), state of São Paulo, Brazil.

Chromosome spreads were obtained from intestine according to Schmid (1978), and chromosomes were analyzed after conventional staining, silver staining of nucleolus organizer regions (Ag-NORs), and CBG banding (King, 1980), following routine techniques. Only metaphases that allowed counting chromosomes with confidence were considered in the analyses.

RESULTS AND DISCUSSION

Cytogenetic analyses of 43 of 177 metaphases of *L. percarinatum* and 33 of 163 metaphases of *L. ferreirai* (Table 1) revealed a diploid number of 44, with 10 pairs of biarmed macrochromosomes and 12 pairs of microchromosomes (Fig. 1A, B). Despite the difficulty in obtaining good quality chromosome spreads in lizards, especially from intestinal epithelial cells, some metaphases clearly revealed the presence of 12 biarmed microchromosome pairs.

Both species of *Leposoma* showed the Ag-NOR regions located on the telomeres of the long arm of one small-sized microchromosome pair (Fig. 1C), and it was possible to identify an intrapopulational heteromorphism in size of Ag-NORs in more than 85% of the cells analyzed for the three specimens of *L. percarinatum* (Table 1; Fig. 1C). The unequal-sized homologous Ag-NORs may be caused by differences either in activity between both NORs or in the number of ribosomal sequence copies between homologues, which may arise by duplication in one of the two NORs (Schmid, 1982) or unequal crossing-over among repeated sequences (Amaro-Ghilardi et al., 2008; Garcia and Moreira-Filho, 2008). With the data available thus far, we cannot reject any of these possibilities to explain the heteromorphism observed in the size of Ag-NORs in the diploid form of *L. percarinatum*. C-banding patterns obtained here for two species of *Leposoma* revealed heterochromatic blocks on the telomeric and pericentromeric regions of macrochromosomes and on telomeric regions of some microchromosomes (Fig. 2A, B). In *L. ferreirai* it was possible to identify centromeric C-bands in some microchromosomes (Fig. 2B).

We are aware that we had access to only three specimens of *L. percarinatum*, all females. Although this sample size is small, all specimens were identical

FIG. 1. Karyotypes of *Leposoma* species from Estação Ecológica de Anavilhanas, Amazonas, Brazil. (a) *Leposoma percarinatum*, female, $2n = 44$ (20M + 24m) and (b) *Leposoma ferreirai*, male, $2n = 44$ (20M + 24m), after conventional staining. (c) Ag-NORs on the telomere region of a small-sized microchromosome pair in *L. percarinatum*, showing heteromorphic (left) and homomorphic NORs (middle), and in *Leposoma ferreirai* (right). Bar = 10 μm.

to those attributed to *L. percarinatum*, from which only females were obtained in all populations studied thus far. Based on this, we assume that the population from Anavilhanas investigated here is also parthenogenetic. The description of a very similar diploid karyotype of $2n = 44$ (20M + 24m) in conventional and differential staining for *L. percarinatum* and its bisexual relative *L. ferreirai*, both sympatric in the lower Rio Negro area (Anavilhanas), provides new insight into the origin of parthenogenesis in *L. percarinatum* and determination

of its putative parental species. We know now that within the unisexual *L. percarinatum* complex, there are both a diploid form found in Anavilhanas area, which is sympatric to *L. ferreirai* and *L. guianense*, and a triploid lineage previously observed in specimens from Vila Rica, state of Mato Grosso, Brazil (Pellegrino et al., 2003). The present data support the hypothesis proposed by Pellegrino et al. (2003) for the existence of a diploid unisexual of the *L. percarinatum* complex and its contribution to the origin of the triploid clone.

FIG. 2. C-banding patterns in *Leposoma* species. (a) *Leposoma percarinatum*. (b) *Leposoma ferreirai*.

Based on geographic distribution, Rodrigues and Ávila-Pires (2005) proposed a scenario for the evolution of the unisexual diploid clone of the *L. percarinatum* complex through hybridization between *L. ferreirai* and *L. guianense*, which may receive some support from the cytogenetic data reported here. For instance, *L. ferreirai*, *L. guianense*, and the diploid form of *L. percarinatum* share a very similar $2n = 44$ (20M + 24m) karyotype, with banded chromosomes, a single microchromosome pair with Ag-NORs, and also similar C-banding patterns.

Forty cases of natural parthenogenesis are known to date within eight lizard families, and almost all well-studied cases are considered to have had a hybrid origin (Kearney et al., 2009). In the Teiidae, which is the sister family of the Gymnophthalmidae, there are reports on several unisexual species, and all parthenogens have a clonal pattern of inheritance and a hybrid origin (Reeder et al., 2002). Similar to what was suggested for *Leposoma* here, some species of *Cnemidophorus* and *Aspidoscelis* have triploid clonal parthenogens, which were produced by hybridization between a diploid parthenogen of hybrid origin and closely related bisexual ancestors (Cole and Dessauer, 1993; Reeder et al., 2002; Woolley et al., 2004).

Currently, all known specimens (more than a hundred) attributed to *L. percarinatum* are females. Considering that the type locality of the species is Peixe Boi, in the state of Pará, Brazil, from which karyotype data are unknown, further taxonomic work, supported by robust information on geographic distribution of the parthenoforms, is still needed to accurately resolve the taxonomy of this species complex.

Although the present cytogenetic data contribute to the understanding of the origin of parthenogenesis in *Leposoma*, additional chromosomal studies based on differential staining techniques for triploid specimens and other species of *Leposoma* are still needed in order to allow homologies to be inferred with confidence and expand our knowledge about karyotypic evolution in the genus. Along with chromosome data, those results generated on the basis of phylogenetic studies (KCM Pellegrino, MT Rodrigues, JD Harris, Y Yonenaga-Yassuda, and JW Sites Jr., unpubl. data) should improve the search for the parental lineages of the parthenogenetic species in the *L. percarinatum* complex.

Acknowledgments.—The authors are grateful to Laboratório de Ictiogenética and to R. C. Amaro (IBUSP) for assistance during lab work and also to IBAMA and the staff of Estação Ecológica de Anavilhanas for collecting permits and help in the field. Grants were from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

LITERATURE CITED

- AMARO-GHILARDI, R. C., M. J. J. SILVA, M. T. RODRIGUES, AND Y. YONENAGA-YASSUDA. 2008. Chromosomal studies in four species of genus *Chaunus* (Bufonidae, Anura): localization of telomeric and ribosomal sequences after fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Genetica* 134:159–168.
- COLE, C. J., AND H. C. DESSAUER. 1993. Unisexual and bisexual whiptail lizards of the *Cnemidophorus lemniscatus* complex (Squamata: Teiidae) of the Guiana region, South America, with descriptions of new species. *American Museum Novitates* 3081:1–30.
- COLE, C. J., H. C. DESSAUER, C. R. TOWNSEND, AND M. G. ARNOLD. 1990. Unisexual lizards of the genus *Gymnophthalmus* (Reptilia, Teiidae) in the Neotropics: genetics, origin, and systematics. *American Museum Novitates* 2994:1–29.
- ESQUEDA, L. F. 2005. Un nuevo *Leposoma* (Squamata: Gymnophthalmidae) de la reserva forestal de Caparo, Estado Barinas, Venezuela. *Herpetotrópicos* 2:33–42.
- GARCIA, C., AND O. MOREIRA-FILHO. 2008. Localization of ribosomal genes in three *Pimelodus* species (Siluriformes, Pimelodidae) of the São Francisco River: 5S genes as species markers and conservation of the 18S rDNA sites. *Genetics and Molecular Biology* 31:261–264.
- KEARNEY, M., M. K. FUJITA, AND J. RIDENOUR. 2009. Lost sex in reptiles: constraints and correlations. In I. Schön, K. Martens, and P. van Dijk (eds.), *Lost Sex*. Springer Scientific, Dordrecht, Netherlands.
- KING, M. 1980. C-banding studies on Australian hylid frogs: secondary constriction structure and the concept of euchromatin transformation. *Chromosoma* 80:191–217.
- KOK, P. J. R. 2009. Lizard in the clouds: a new highland genus and species of Gymnophthalmidae (Reptilia: Squamata) from Maringá tepui, western Guyana. *Zootaxa* 1992:53–67.
- PELLEGRINO, K. C. M., M. T. RODRIGUES, AND Y. YONENAGA-YASSUDA. 1999a. Chromosomal evolution in Brazilian lizards of genus *Leposoma* (Squamata, Gymnophthalmidae) from Amazon and Atlantic forests: banding patterns and FISH of telomeric sequences. *Hereditas* 131:15–21.
- . 1999b. Chromosomal polymorphisms due to supernumerary chromosomes and pericentric inversions in the eyelidless microteiid lizard *Nothobachia ablephara* (Squamata, Gymnophthalmidae). *Chromosome Research* 7:247–254.
- PELLEGRINO, K. C. M., M. T. RODRIGUES, Y. YONENAGA-YASSUDA, AND J. W. SITES JR. 2001. A molecular perspective on the evolution of microteiid lizards (Squamata, Gymnophthalmidae), and a new classification for the family. *Biological Journal of Linnean Society* 74:317–340.
- PELLEGRINO, K. C. M., M. T. RODRIGUES, AND Y. YONENAGA-YASSUDA. 2003. Triploid karyotype of *Leposoma percarinatum* (Squamata, Gymnophthalmidae). *Journal of Herpetology* 37:197–199.
- REEDER, T. W., C. H. COLE, AND H. C. DESSAUER. 2002. Phylogenetic relationships of whiptail lizards of the genus *Cnemidophorus* (Squamata: Teiidae): a test of monophyly, reevaluation of karyotypic evolution, and review of hybrid origins. *American Museum Novitates* 3365:1–61.
- RODRIGUES, M. T. 1997. A new species of *Leposoma* (Squamata, Gymnophthalmidae) from the Atlantic forest of Brazil. *Herpetologica* 53:383–389.
- RODRIGUES, M. T., AND T. C. ÁVILA-PIRES. 2005. New lizard of the genus *Leposoma* (Squamata, Gymnophthalmidae) from the lower Rio Negro, Ama-

- zonas, Brazil. *Journal of Herpetology* 39:541–546.
- RODRIGUES, M. T., AND D. M. BORGES. 1997. A new species of *Leposoma* (Squamata, Gymnophthalmidae) from a relictual forest in semiarid northeastern Brazil. *Herpetologica* 53:1–6.
- RODRIGUES, M. T., M. DIXO, AND G. M. D. ACCACIO. 2002. A large sample of *Leposoma* (Squamata, Gymnophthalmidae) from the Atlantic forests of Bahia, the status of *Leposoma annectans* Ruibal, 1952, and notes on conservation. *Papéis Avulsos de Zoologia* 42:103–117.
- RODRIGUES, M. T., D. PAVAN, F. CURCIO, V. K. VERDADE, J. CASSIMIRO, AND K. C. M. PELLEGRINO. 2009. A new genus of microteiid lizard from the Caparaó Mountains, southeastern Brazil, with a discussion of relationships among Gymnophthalminae (Squamata). *American Museum Novitates* 3673:1–27.
- RUIBAL, R. 1952. Revisionary studies of some South American Teiidae. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology* 106:407–529.
- SCHMID, M. 1978. Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma* 66:361–388.
- . 1982. Chromosome banding in Amphibia. VII. Analysis of the structure and variability of NORs in Anura. *Chromosoma* 87:327–344.
- UZZELL, T., AND J. C. BARRY. 1971. *Leposoma percarinatum*, a unisexual species related to *L. guianense*, and *Leposoma ioanna*, a new species from Pacific coastal Colômbia (Sauria, Teiidae). *Postilla, Peabody Museum* 154:1–39.
- WOOLLEY, S. C., J. T. SAKATA, AND D. CREWS. 2004. Tracing the evolution of brain and behavior using two related species of whiptail lizards: *Cnemidophorus uniparens* and *Cnemidophorus inornatus*. *ILAR Journal* 45:46–53.
- YONENAGA-YASSUDA, Y., AND M. T. RODRIGUES. 1999. Supernumerary chromosome variation, heteromorphic sex chromosomes and banding patterns in microteiid lizards of the genus *Micrablepharus* (Squamata, Gymnophthalmidae). *Chromosome Research* 7:21–29.
- YONENAGA-YASSUDA, Y., M. T. RODRIGUES, AND K. C. M. PELLEGRINO. 2005. Chromosomal banding patterns in the eyelid-less microteiid radiation: the $X_1X_2Y:X_1X_1X_2X_2$ sex chromosome system in *Calypotommatus*, and the karyotypes of *Psilophthalmus* and *Tretioscincus* (Squamata, Gymnophthalmidae). *Genetics and Molecular Biology* 28:700–709.

Accepted: 18 March 2009.

Anexo 3

Anexo 3: Distâncias genéticas par a par não corrigida para os genes 16S, citocromo *b*, ND₂, ND₄, *c-mos* e NT₃.

	16S	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	Alopoglossus angulatus	-											
2	Arthrosaura kockii 1	0.13965	-										
3	Arthrosaura kockii 2	0.13967	0.00000	-									
4	Arthrosaura reticulata 1	0.13899	0.15018	0.14323	-								
5	Arthrosaura reticulata 2	0.13868	0.14353	0.13857	0.01011	-							
6	Anotosaura vanzolinia 1	0.10871	0.12720	0.12098	0.10590	0.10993	-						
7	Anotosaura vanzolinia 2	0.10861	0.12258	0.12078	0.10337	0.10813	0.00000	-					
8	Colobosauroides carvalhoi 1	0.10359	0.12358	0.12179	0.11526	0.11355	0.04448	0.04431	-				
9	Colobosauroides cearensis 1	0.11828	0.13988	0.13206	0.11210	0.11006	0.04571	0.04630	0.01964	-			
10	Cercosaura ocellata 1	0.13733	0.16271	0.16385	0.15325	0.14685	0.14142	0.14127	0.12371	0.13743	-		
11	Cercosaura ocellata 2	0.13754	0.16496	0.16408	0.15741	0.15124	0.13840	0.14262	0.12398	0.13548	0.00000	-	
12	Dryadosaura nordestina	0.10496	0.12262	0.11349	0.10496	0.10550	0.03076	0.03100	0.05080	0.06207	0.13230	0.13229	-
13	Ecpleopus gaudichaudii 1	0.11143	0.11902	0.11464	0.09143	0.08928	0.07090	0.06478	0.08253	0.09356	0.13132	0.13971	0.06887
14	Ecpleopus gaudichaudii 2	0.11183	0.12213	0.11726	0.09642	0.09427	0.07166	0.06542	0.08109	0.09235	0.13237	0.14016	0.07171
15	Kaieteurosaurus hindsii	0.12835	0.12175	0.12161	0.11153	0.10637	0.09980	0.09969	0.09741	0.09698	0.13710	0.13733	0.09299
16	Leposoma ferreirai 1	0.13548	0.14726	0.14286	0.13323	0.12765	0.10584	0.09569	0.08908	0.09936	0.13652	0.13779	0.10825
17	Leposoma ferreirai 2	0.13448	0.14945	0.14442	0.13349	0.12798	0.10414	0.09500	0.08832	0.09879	0.13881	0.13912	0.10651
18	Leposoma percarinatum diplóide 1	0.13035	0.14132	0.13182	0.11086	0.11128	0.09741	0.09086	0.09256	0.10913	0.13393	0.13753	0.08728
19	Leposoma percarinatum diplóide 2	0.13258	0.14112	0.13165	0.11117	0.11166	0.10031	0.09537	0.09511	0.11154	0.13644	0.13983	0.09266
20	Leposoma percarinatum triplóide 1	0.13281	0.14656	0.13979	0.11886	0.12098	0.10504	0.09676	0.09503	0.10924	0.13191	0.13560	0.10040
21	Leposoma percarinatum triplóide 2	0.13312	0.14752	0.14013	0.11805	0.12017	0.10242	0.09546	0.09373	0.10815	0.13293	0.13583	0.09772
22	Leposoma scincoides	0.13752	0.13671	0.12895	0.14124	0.13867	0.11291	0.10885	0.10462	0.11036	0.15668	0.16051	0.10780
23	Placosoma glabellum	0.15850	0.19285	0.19359	0.17918	0.18526	0.18113	0.18545	0.17528	0.17780	0.13736	0.13832	0.16261
24	Scriptosaura catimbau 1	0.12815	0.11762	0.11748	0.11098	0.11074	0.09338	0.09315	0.09379	0.09569	0.11396	0.11415	0.09033
25	Scriptosaura catimbau 2	0.12815	0.11762	0.11748	0.11098	0.11074	0.09338	0.09315	0.09379	0.09569	0.11396	0.11415	0.09033

	16S	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	Alopoglossus angulatus												
2	Arthrosaura kockii 1												
3	Arthrosaura kockii 2												
4	Arthrosaura reticulata 1												
5	Arthrosaura reticulata 2												
6	Anotosaura vanzolinia 1												
7	Anotosaura vanzolinia 2												
8	Colobosauroides carvalhoi 1												
9	Colobosauroides cearensis 1												
10	Cercosaura ocellata 1												
11	Cercosaura ocellata 2												
12	Dryadosaura nordestina												
13	Ecpleopus gaudichaudii 1	-											
14	Ecpleopus gaudichaudii 2	0.00414	-										
15	Kaieueosaurus hindsii	0.08756	0.09013	-									
16	Leposoma ferreirai 1	0.11395	0.11924	0.12955	-								
17	Leposoma ferreirai 2	0.11562	0.12003	0.12968	0.00208	-							
18	Leposoma percarinatum diplóide 1	0.10355	0.10868	0.10940	0.07355	0.07468	-						
19	Leposoma percarinatum diplóide 2	0.10363	0.10879	0.11429	0.07970	0.07981	0.00809	-					
20	Leposoma percarinatum triplóide 1	0.09551	0.10058	0.12391	0.05949	0.06056	0.04312	0.03910	-				
21	Leposoma percarinatum triplóide 2	0.09619	0.10081	0.12421	0.05998	0.05984	0.04335	0.03874	0.00000	-			
22	Leposoma scincoides	0.11933	0.12024	0.11732	0.14281	0.14331	0.12030	0.12085	0.12567	0.12492	-		
23	Placosoma glabellum	0.15675	0.15949	0.17631	0.16235	0.16220	0.16889	0.16447	0.16533	0.16386	0.19253	-	
24	Scriptosaura catimbau 1	0.09898	0.10186	0.12384	0.11793	0.11941	0.11074	0.11316	0.10762	0.10798	0.10561	0.15001	-
25	Scriptosaura catimbau 2	0.09898	0.10186	0.12384	0.11793	0.11941	0.11074	0.11316	0.10762	0.10798	0.10561	0.15001	0.00000

citocromo <i>b</i>		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	Arthrosaura kockii 1	-											
2	Arthrosaura kockii 2	0.00000	-										
3	Arthrosaura reticulata 1	0.00000	0.00000	-									
4	Anotosaura vanzolinia 1	0.19735	0.19735	0.19735	-								
5	Anotosaura vanzolinia 2	0.19735	0.19735	0.19735	0.00000	-							
6	Colobosauroides carvalhoi 1	0.19848	0.19848	0.19848	0.14808	0.14808	-						
7	Colobosauroides cearensis 1	0.20896	0.20896	0.20896	0.16086	0.16086	0.06713	-					
8	Colobosauroides cearensis 2	0.21393	0.21393	0.21393	0.16252	0.16252	0.06702	0.00663	-				
9	Cercosaura ocellata 2	0.22554	0.22554	0.22554	0.23549	0.23549	0.20398	0.21227	0.21559	-			
10	Dryadosaura nordestina	0.19615	0.19615	0.19615	0.14760	0.14760	0.14856	0.14681	0.14943	0.20260	-		
11	Ecpleopus gaudichaudii 1	0.19900	0.19900	0.19900	0.21891	0.21891	0.18331	0.20232	0.20564	0.20564	0.19201	-	
12	Ecpleopus gaudichaudii 2	0.20029	0.20029	0.20029	0.22792	0.22792	0.19219	0.21691	0.22060	0.21469	0.19398	0.02773	-
13	Leposoma percarinatum triplóide 1	0.20743	0.20743	0.20743	0.20783	0.20783	0.21725	0.23125	0.23119	0.22238	0.21368	0.22921	0.22896
14	Leposoma percarinatum triplóide 2	0.21346	0.21346	0.21346	0.21007	0.21007	0.21175	0.22815	0.22815	0.22667	0.21375	0.23005	0.23139
15	Leposoma scincoides	0.20564	0.20564	0.20564	0.21891	0.21891	0.18537	0.19403	0.19237	0.21393	0.18052	0.19900	0.19277
16	Scriptosaura catimbau 1	0.21061	0.21061	0.21061	0.20232	0.20232	0.18663	0.20398	0.20066	0.21227	0.20315	0.21227	0.21197
17	Scriptosaura catimbau 2	0.21393	0.21393	0.21393	0.20564	0.20564	0.18855	0.20398	0.20066	0.21559	0.20315	0.21559	0.21361

citocromo <i>b</i>		13	14	15	16	17
1	Arthrosaura kockii 1					
2	Arthrosaura kockii 2					
3	Arthrosaura reticulata 1					
4	Anotosaura vanzolinia 1					
5	Anotosaura vanzolinia 2					
6	Colobosauroides carvalhoi 1					
7	Colobosauroides cearensis 1					
8	Colobosauroides cearensis 2					
9	Cercosaura ocellata 2					
10	Dryadosaura nordestina					
11	Ecpleopus gaudichaudii 1					
12	Ecpleopus gaudichaudii 2					
13	Leposoma percarinatum triplóide 1	-				
14	Leposoma percarinatum triplóide 2	0.00000	-			
15	Leposoma scincoides	0.22225	0.22830	-		
16	Scriptosaura catimbau 1	0.22261	0.22857	0.21393	-	
17	Scriptosaura catimbau 2	0.22422	0.23190	0.21725	0.00332	-

	ND ₂	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	Alopoglossus angulatus	-											
2	Arthrosaura kockii 1	0.27439	-										
3	Arthrosaura kockii 2	0.27439	0.00000	-									
4	Arthrosaura reticulata 1	0.32706	0.23958	0.23958	-								
5	Arthrosaura reticulata 2	0.32507	0.23693	0.23693	0.04193	-							
6	Anotosaura vanzolinia 1	0.28889	0.22917	0.22917	0.25625	0.26626	-						
7	Anotosaura vanzolinia 2	0.28889	0.22917	0.22917	0.25625	0.26626	0.00000	-					
8	Colobosauroides carvalhoi 1	0.29724	0.23958	0.23958	0.27083	0.27454	0.17917	0.17917	-				
9	Colobosauroides carvalhoi 2	0.28462	0.22588	0.22588	0.26154	0.26103	0.17166	0.17166	0.03141	-			
10	Colobosauroides cearensis 1	0.27809	0.23333	0.23333	0.26458	0.26411	0.17917	0.17917	0.08333	0.09423	-		
11	Colobosauroides cearensis 2	0.28059	0.23222	0.23222	0.25949	0.25472	0.17324	0.17324	0.07391	0.08655	0.03584	-	
12	Cercosaura ocellata 1	0.31438	0.30417	0.30417	0.33750	0.33540	0.32083	0.32083	0.30000	0.29080	0.29167	0.29339	-
13	Cercosaura ocellata 2	0.31647	0.30208	0.30208	0.33750	0.33539	0.31875	0.31875	0.29792	0.28871	0.28958	0.29128	0.00208
14	Dryadosaura nordestina	0.28894	0.23333	0.23333	0.25208	0.24951	0.11042	0.11042	0.16875	0.15492	0.16042	0.15841	0.33125
15	Ecpleopus gaudichaudii 1	0.30174	0.24792	0.24792	0.25417	0.25992	0.23125	0.23125	0.26042	0.25102	0.24792	0.25315	0.30625
16	Ecpleopus gaudichaudii 2	0.29959	0.24375	0.24375	0.25208	0.26203	0.22500	0.22500	0.25417	0.24475	0.24375	0.24891	0.30625
17	Leposoma ferreirai 1	0.30384	0.21667	0.21667	0.23958	0.24952	0.20833	0.20833	0.24583	0.24281	0.25000	0.24516	0.28750
18	Leposoma ferreirai 2	0.30384	0.21667	0.21667	0.23958	0.24952	0.20833	0.20833	0.24583	0.24281	0.25000	0.24516	0.28750
19	Leposoma percarinatum diplóide 1	0.29759	0.22500	0.22500	0.25833	0.25372	0.21458	0.21458	0.24167	0.24053	0.23125	0.23427	0.28750
20	Leposoma percarinatum diplóide 2	0.29759	0.22500	0.22500	0.25833	0.25372	0.21458	0.21458	0.24167	0.24053	0.23125	0.23427	0.28750
21	Leposoma percarinatum triplóide 1	0.31246	0.22917	0.22917	0.25208	0.24322	0.23333	0.23333	0.24167	0.22576	0.23750	0.24249	0.29583
22	Leposoma percarinatum triplóide 2	0.31246	0.22917	0.22917	0.25208	0.24322	0.23333	0.23333	0.24167	0.22576	0.23750	0.24249	0.29583
23	Placosoma glabellum	0.30150	0.28542	0.28542	0.31458	0.31657	0.30625	0.30625	0.30625	0.30113	0.29792	0.29317	0.26250
24	Scriptosaura catimbau 1	0.27637	0.25336	0.25336	0.29968	0.30364	0.25327	0.25327	0.25938	0.25529	0.25091	0.25105	0.28311
25	Scriptosaura catimbau 2	0.27637	0.25336	0.25336	0.29968	0.30364	0.25327	0.25327	0.25938	0.25529	0.25091	0.25105	0.28311

	ND ₂	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	Alopoglossus angulatus												
2	Arthrosaura kockii 1												
3	Arthrosaura kockii 2												
4	Arthrosaura reticulata 1												
5	Arthrosaura reticulata 2												
6	Anotosaura vanzolinia 1												
7	Anotosaura vanzolinia 2												
8	Colobosauroides carvalhoi 1												
9	Colobosauroides carvalhoi 2												
10	Colobosauroides cearensis 1												
11	Colobosauroides cearensis 2												
12	Cercosaura ocellata 1												
13	Cercosaura ocellata 2	-											
14	Dryadosaura nordestina	0.32917	-										
15	Ecpleopus gaudichaudii 1	0.30417	0.21458	-									
16	Ecpleopus gaudichaudii 2	0.30417	0.20833	0.00833	-								
17	Leposoma ferreirai 1	0.28542	0.20000	0.23125	0.22500	-							
18	Leposoma ferreirai 2	0.28542	0.20000	0.23125	0.22500	0.00000	-						
19	Leposoma percarinatum diplóide 1	0.28542	0.22500	0.25000	0.25417	0.15208	0.15208	-					
20	Leposoma percarinatum diplóide 2	0.28542	0.22500	0.25000	0.25417	0.15208	0.15208	0.00000	-				
21	Leposoma percarinatum triplóide 1	0.29375	0.21667	0.23125	0.23542	0.18333	0.18333	0.10833	0.10833	-			
22	Leposoma percarinatum triplóide 2	0.29375	0.21667	0.23125	0.23542	0.18333	0.18333	0.10833	0.10833	0.00000	-		
23	Placosoma glabellum	0.26042	0.30833	0.29792	0.29792	0.29375	0.29375	0.27708	0.27708	0.27500	0.27500	-	
24	Scriptosaura catimbau 1	0.28100	0.25530	0.24702	0.24066	0.27043	0.27043	0.26597	0.26597	0.26155	0.26155	0.26169	-
25	Scriptosaura catimbau 2	0.28100	0.25530	0.24702	0.24066	0.27043	0.27043	0.26597	0.26597	0.26155	0.26155	0.26169	0.00000

	ND ₄	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	Arthrosaura kockii 1	-											
2	Arthrosaura kockii 2	0.00185	-										
3	Arthrosaura reticulata 1	0.23479	0.23567	-									
4	Arthrosaura reticulata 2	0.21035	0.22016	0.06206	-								
5	Anotosaura vanzolinia 1	0.23034	0.23680	0.22553	0.21693	-							
6	Anotosaura vanzolinia 2	0.23191	0.23680	0.22396	0.21530	0.00320	-						
7	Colobosauroides carvalhoi 2	0.23423	0.23200	0.21767	0.22507	0.16160	0.16480	-					
8	Colobosauroides cearensis 1	0.25204	0.25568	0.20990	0.22654	0.17317	0.17639	0.09218	-				
9	Cercosaura ocellata 1	0.25017	0.26202	0.24553	0.23716	0.26975	0.27141	0.26342	0.26148	-			
10	Dryadosaura nordestina	0.22278	0.23040	0.23074	0.22663	0.14560	0.14880	0.18560	0.19409	0.26334	-		
11	Ecpleopus gaudichaudii 1	0.20120	0.20183	0.24878	0.22933	0.22585	0.22584	0.24542	0.24356	0.26667	0.23907	-	
12	Kaieteurosaurus hindsii	0.22174	0.21920	0.24042	0.23949	0.19840	0.20000	0.22240	0.22323	0.22777	0.20960	0.21305	-
13	Leposoma ferreirai 1	0.23289	0.23680	0.26664	0.24771	0.23040	0.23040	0.23840	0.24914	0.27351	0.24000	0.21826	0.23040
14	Leposoma ferreirai 2	0.23297	0.23680	0.26501	0.24612	0.23040	0.23040	0.23840	0.25238	0.27349	0.23840	0.21502	0.22880
15	Leposoma percarinatum diplóide 2	0.21980	0.22982	0.24464	0.23463	0.22990	0.23313	0.24771	0.25081	0.26155	0.24427	0.20613	0.22806
16	Leposoma percarinatum triplóide 2	0.21726	0.21804	0.23471	0.22290	0.21337	0.21333	0.22368	0.23505	0.25302	0.21836	0.19854	0.20807
17	Leposoma scincoides	0.21879	0.23080	0.25691	0.24837	0.24004	0.24004	0.24219	0.23494	0.25528	0.23546	0.22602	0.22598
18	Placosoma glabellum	0.26218	0.26240	0.26800	0.26067	0.26240	0.26240	0.27360	0.27514	0.24897	0.28640	0.25540	0.25920
19	Scriptosaura catimbau 2	0.22553	0.22775	0.26335	0.24873	0.23442	0.23788	0.24165	0.24840	0.22587	0.25219	0.22267	0.24349

	ND ₄	13	14	15	16	17	18	19
1	Arthrosaura kockii 1							
2	Arthrosaura kockii 2							
3	Arthrosaura reticulata 1							
4	Arthrosaura reticulata 2							
5	Anotosaura vanzolinia 1							
6	Anotosaura vanzolinia 2							
7	Colobosauroides carvalhoi 2							
8	Colobosauroides cearensis 1							
9	Cercosaura ocellata 1							
10	Dryadosaura nordestina							
11	Ecpleopus gaudichaudii 1							
12	Kaieteurosaurus hindsii							
13	Leposoma ferreirai 1	-						
14	Leposoma ferreirai 2	0.00320	-					
15	Leposoma percarinatum diplóide 2	0.17471	0.17150	-				
16	Leposoma percarinatum triplóide 2	0.16029	0.16036	0.09939	-			
17	Leposoma scincoides	0.15432	0.15108	0.16922	0.15776	-		
18	Placosoma glabellum	0.26400	0.26400	0.26391	0.24695	0.25181	-	
19	Scriptosaura catimbau 2	0.24851	0.24857	0.23494	0.23633	0.22928	0.22273	-

<i>c-mos</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 Arthrosaura reticulata 1	-											
2 Arthrosaura reticulata 2	0.00000	-										
3 Anotosaura vanzolinia 2	0.00000	0.00258	-									
4 Colobosauroides carvalhoi 1	0.23453	0.22830	0.22774	-								
5 Colobosauroides carvalhoi 2	0.23573	0.23201	0.23461	0.00514	-							
6 Colobosauroides cearensis 1	0.24155	0.23462	0.23721	0.00516	0.01279	-						
7 Cercosaura ocellata 1	0.12503	0.12118	0.12373	0.20912	0.21352	0.21349	-					
8 Cercosaura ocellata 2	0.12524	0.12512	0.12534	0.21273	0.21762	0.21751	0.00250	-				
9 Dryadosaura nordestina	0.00000	0.00000	0.00258	0.22830	0.23201	0.23462	0.12118	0.12512	-			
10 Ecpleopus gaudichaudii 1	0.15139	0.14943	0.14926	0.13576	0.13782	0.14108	0.14058	0.14136	0.14943	-		
11 Ecpleopus gaudichaudii 2	0.15152	0.14889	0.14870	0.13468	0.13963	0.13988	0.14032	0.14022	0.14889	0.00000	-	
12 Kaieteurosaurus hindsii	0.18638	0.18646	0.18917	0.14686	0.14107	0.15165	0.17487	0.17923	0.18646	0.09577	0.10101	-
13 Leposoma ferreirai 1	0.24889	0.24577	0.24846	0.17629	0.17071	0.17614	0.24295	0.24738	0.24577	0.19679	0.19892	0.18877
14 Leposoma percarinatum diplóide 1	0.24889	0.24577	0.24846	0.17629	0.17071	0.17614	0.24295	0.24738	0.24577	0.19679	0.19892	0.18877
15 Leposoma percarinatum diplóide 2	0.24889	0.24577	0.24846	0.17629	0.17071	0.17614	0.24295	0.24738	0.24577	0.19679	0.19892	0.18877
16 Leposoma scincoides	0.14883	0.14705	0.14974	0.13384	0.12809	0.13868	0.13333	0.13719	0.14705	0.03739	0.04000	0.08660
17 Placosoma glabellum	0.13068	0.12988	0.13008	0.22476	0.22641	0.22971	0.10486	0.10528	0.12988	0.12625	0.12651	0.16316
18 Scriptosaura catimbau 1	0.16241	0.16235	0.16241	0.23679	0.23883	0.24181	0.15201	0.15231	0.16235	0.17055	0.17098	0.18934

<i>c-mos</i>		13	14	15	16	17	18
1	Arthrosaura reticulata 1						
2	Arthrosaura reticulata 2						
3	Anotosaura vanzolinia 2						
4	Colobosauroides carvalhoi 1						
5	Colobosauroides carvalhoi 2						
6	Colobosauroides cearensis 1						
7	Cercosaura ocellata 1						
8	Cercosaura ocellata 2						
9	Dryadosaura nordestina						
10	Ecpleopus gaudichaudii 1						
11	Ecpleopus gaudichaudii 2						
12	Kaieteurosaurus hindsii						
13	Leposoma ferreirai 1	-					
14	Leposoma percarinatum diplóide 1	0.00000	-				
15	Leposoma percarinatum diplóide 2	0.00000	0.00000	-			
16	Leposoma scincoides	0.17592	0.17592	0.17592	-		
17	Placosoma glabellum	0.26015	0.26015	0.26015	0.13688	-	
18	Scriptosaura catimbau 1	0.25672	0.25672	0.25672	0.16250	0.14713	-

NT ₃	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 Alopoglossus angulatus	-											
2 Arthrosaura kockii 1	0.13135	-										
3 Arthrosaura kockii 2	0.13135	0.00000	-									
4 Arthrosaura reticulata 1	0.15675	0.08349	0.08349	-								
5 Arthrosaura reticulata 2	0.14983	0.08015	0.08015	0.01157	-							
6 Anotosaura vanzolinia 1	0.12473	0.07161	0.07161	0.09310	0.08810	-						
7 Anotosaura vanzolinia 2	0.12473	0.07161	0.07161	0.09310	0.08810	0.00000	-					
8 Colobosauroides carvalhoi 1	0.12476	0.07164	0.07164	0.08811	0.08477	0.01827	0.01827	-				
9 Colobosauroides carvalhoi 2	0.12337	0.07010	0.07010	0.08647	0.08328	0.01668	0.01668	0.00000	-			
10 Colobosauroides cearensis 1	0.12345	0.06838	0.06838	0.08990	0.08489	0.01827	0.01827	0.00832	0.00499	-		
11 Colobosauroides cearensis 2	0.12365	0.06848	0.06848	0.08835	0.08501	0.01995	0.01995	0.00831	0.00499	0.00000	-	
12 Dryadosaura nordestina	0.14045	0.08485	0.08485	0.09976	0.09476	0.02326	0.02326	0.03156	0.02998	0.03331	0.03496	-
13 Ecpleopus gaudichaudii 1	0.17024	0.10808	0.10808	0.11306	0.11139	0.09801	0.09801	0.09635	0.09486	0.09320	0.09322	0.08804
14 Ecpleopus gaudichaudii 2	0.17016	0.11279	0.11279	0.11633	0.11462	0.10184	0.10184	0.10014	0.09855	0.09693	0.09689	0.09157
15 Leposoma ferreirai 1	0.14283	0.07325	0.07325	0.08316	0.07815	0.09136	0.09136	0.08804	0.08654	0.08970	0.08982	0.09967
16 Leposoma ferreirai 2	0.14272	0.07452	0.07452	0.08310	0.07794	0.09315	0.09315	0.08973	0.08824	0.09137	0.09154	0.10161
17 Leposoma percarinatum diplóide 1	0.14199	0.07875	0.07875	0.08369	0.07868	0.08688	0.08688	0.09025	0.08880	0.09199	0.09212	0.09861
18 Leposoma percarinatum diplóide 2	0.14617	0.08319	0.08319	0.08813	0.08312	0.09136	0.09136	0.09468	0.09323	0.09635	0.09645	0.10299
19 Leposoma percarinatum triplóide 1	0.14277	0.08328	0.08328	0.08653	0.08320	0.09144	0.09144	0.09473	0.09335	0.09641	0.09653	0.10309
20 Leposoma percarinatum triplóide 2	0.14128	0.08327	0.08327	0.08664	0.08328	0.09143	0.09143	0.09473	0.09334	0.09641	0.09653	0.10313
21 Placosoma glabellum	0.16582	0.16085	0.16085	0.16032	0.15515	0.14324	0.14324	0.15178	0.15190	0.15017	0.15025	0.14847
22 Scriptosaura catimbau 1	0.10770	0.13678	0.13678	0.16237	0.15727	0.13746	0.13746	0.13922	0.13788	0.13607	0.13622	0.15487
23 Scriptosaura catimbau 2	0.10077	0.13000	0.13000	0.15560	0.15050	0.13066	0.13066	0.13243	0.13107	0.12928	0.12942	0.14979

	NT ₃	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1	Alopoglossus angulatus											
2	Arthrosaura kockii 1											
3	Arthrosaura kockii 2											
4	Arthrosaura reticulata 1											
5	Arthrosaura reticulata 2											
6	Anotosaura vanzolinia 1											
7	Anotosaura vanzolinia 2											
8	Colobosauroides carvalhoi 1											
9	Colobosauroides carvalhoi 2											
10	Colobosauroides cearensis 1											
11	Colobosauroides cearensis 2											
12	Dryadosaura nordestina											
13	Ecpleopus gaudichaudii 1	-										
14	Ecpleopus gaudichaudii 2	0.00000	-									
15	Leposoma ferreirai 1	0.11628	0.12158	-								
16	Leposoma ferreirai 2	0.11850	0.12142	0.00000	-							
17	Leposoma percarinatum diplóide 1	0.11385	0.11915	0.01339	0.01369	-						
18	Leposoma percarinatum diplóide 2	0.11794	0.12337	0.01993	0.02035	0.00000	-					
19	Leposoma percarinatum triplóide 1	0.11803	0.12338	0.01994	0.02031	0.00166	0.00332	-				
20	Leposoma percarinatum triplóide 2	0.11819	0.12357	0.01996	0.02033	0.00166	0.00332	0.00000	-			
21	Placosoma glabellum	0.16895	0.17480	0.16676	0.16995	0.16276	0.16692	0.16521	0.16361	-		
22	Scriptosaura catimbau 1	0.17747	0.17714	0.14304	0.14305	0.14579	0.14992	0.14652	0.14504	0.15654	-	
23	Scriptosaura catimbau 2	0.17582	0.17541	0.13623	0.13614	0.13899	0.14312	0.13971	0.13823	0.15140	0.00694	-