

Renata Gonçalves Magalhães

Relações maternidade e paternidade em  
agrupamentos sociais do lagarto  
*Gymnodactylus amarali* (Squamata,  
Phyllodactylidae): uma análise com base em  
genótipos de microssatélites.

Maternity and paternity relationships within  
social aggregations in the lizard  
*Gymnodactylus amarali* (Squamata,  
Phyllodactylidae): an analysis based on  
microsatellite genotyping.

São Paulo

2021

Renata Gonçalves Magalhães

Relações maternidade e paternidade em agrupamentos sociais do lagarto *Gymnodactylus amarali* (Squamata, Phyllodactylidae): uma análise com base em genótipos de microssatélites.

Maternity and paternity relationships within social aggregations in the lizard *Gymnodactylus amarali* (Squamata, Phyllodactylidae): an analysis based on microsatellite genotyping.

Versão corrigida da dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Zoologia, na Área de Herpetologia.

Orientador(a): Miguel Trefaut Rodrigues.

São Paulo

2021

Magalhães, Renata Gonçalves  
Relações maternidade e paternidade em  
agrupamentos sociais do lagarto *Gymnodactylus  
amarali* (Squamata, Phyllodactylidae): uma  
análise com base em genótipos de  
microssatélites./ Renata Gonçalves Magalhães;  
orientador Miguel Trefaut Rodrigues -- São  
Paulo, 2021.  
51 p.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de  
Biociências da Universidade de São Paulo.  
Departamento de Zoologia.

1. Análise de paternidade e maternidade. 2.  
Microssatélites. 3. Sequenciamento de nova  
geração. I. Rodrigues, Miguel Trefaut, orient.  
II. Título.

## Comissão Julgadora:

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).



Prof. Dr. Miguel Trefaut Rodrigues  
Orientador

À minha família,  
em especial ao meu pai e à minha tia.  
Vocês estarão sempre comigo.

## Agradecimentos

---

Ao Professor Miguel Trefaut Rodrigues, meu orientador, pela oportunidade e confiança depositada em mim, além dos incontáveis empurrões, que me fizeram continuar. Agradeço muito por toda a paciência e carinho com os quais me tratou no momento mais difícil da minha vida.

À Sabrina Baroni, que esteve comigo durante todo o processo, desde aprender a pipetar, no primeiro dia de laboratório, até a finalização desta dissertação. Agradeço imensamente pela dedicação e acompanhamento integral durante todas as etapas deste trabalho. E, além disso, por todos os conselhos, conversas, companheirismo, paciência e carinho durante todos esses anos. Sem você nada disso seria possível.

Aos colegas do laboratório de Herpetologia, que participaram direta ou indiretamente do projeto, desde a coleta dos animais até a concretização desta dissertação.

Aos colegas do laboratório de Sistemática Molecular, Manuel e Beatriz, sempre me socorrendo e orientando.

Ao Centro de Genômica Funcional da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) da Universidade de São Paulo, pelos serviços de sequenciamento de nova geração e análise inicial de bioinformática.

À Tatiana Corrêa, do GaTE Lab, pela ajuda nos trabalhos de genotipagem, fazendo o possível e o impossível para que este projeto e tantos outros continuassem.

Aos professores e funcionários da Universidade de São Paulo, em especial do Departamento de Zoologia, que fizeram parte da minha formação e foram sempre solícitos durante todo esse processo.

À minha mãe, Nadir, por seu carinho, força e amor incondicional, que me levaram a continuar, mesmo quando eu já havia perdido as minhas forças.

Ao meu parceiro, melhor amigo e porto seguro, Augusto, que sempre acreditou em mim, me fazendo rir e trazendo luz para os dias ruins.

Ao meu pai e à minha tia, pelo carinho, companheirismo e força. Espero que, onde estejam, possam se orgulhar.

À Marilda, por me guiar e acompanhar neste caminho doloroso de autoconhecimento, perdas, luto e, finalmente, de superação.

Aos meus tios e primos, em especial ao meu tio João, que esteve sempre ao nosso lado, e ao meu primo Marcelo, que sempre foi e sempre será um exemplo para mim.

Aos meus amigos: Mauro, Amanda, Thaisa, José, Alexandre, Mariana e Gisella, pelas infindáveis conversas e desabafos, pelo apoio e companhia em toda a minha trajetória até aqui.

Aos meus parceiros do colégio, que me encorajaram todos os dias a continuar.

Por fim, o presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (Capes) – Código de financiamento 001, pelas bolsas de mestrado, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento de diversos projetos do laboratório.

Muito obrigada!

## Índice

---

|   |    |
|---|----|
| I. Introdução   |    |
| 1. Comportamento social.....  | 09 |
| 2. Sistema sociais em lagartos.....   | 09 |
| 3. Marcadores moleculares.....  | 10 |
| 4. Técnicas empregadas em análises de maternidade e paternidade.....                          | 11 |
| 5. Considerações sobre a espécie de estudo: <i>Gymnodactylus amarali</i> .....                | 13 |
| II. Objetivos.....  | 15 |
| III. Materiais e métodos  |    |
| 1. Área e métodos de coleta.....  | 16 |
| 2. Estudo molecular   |    |
| 2.1. Extração de DNA.....   | 18 |
| 2.2. Identificação de loci de microssatélites a partir de sequenciamento de nova geração..... | 19 |
| 2.3. Genotipagem dos indivíduos.....  | 20 |
| 3. Análises de maternidade e paternidade.....   | 21 |
| 3.1. Análise de frequência alélica.....   | 22 |
| 3.2. Simulação da análise de maternidade e paternidade.....                                   | 22 |
| 3.3. Análise de maternidade e paternidade.....  | 24 |
| IV. Resultados  |    |
| 1. Isolamento de microssatélites específicos e genotipagem dos indivíduos.....                | 25 |
| 2. Análises de maternidade e paternidade  |    |
| 2.1. Análise de frequência alélica.....   | 26 |

|   |    |
|---|----|
| 2.2. Simulação de análise de maternidade e paternidade.....                                     | 27 |
| 2.3. Análise de maternidade e paternidade.....  | 27 |
| V. Discussão  |    |
| 1. Identificação de microssatélites específicos através de NGS.....                             | 30 |
| 2. Desequilíbrio de ligação.....  | 31 |
| 3. Alelos nulos.....  | 32 |
| 4. Análises de maternidade e paternidade entre indivíduos de <i>Gymnodactylus amarali</i> ..... | 33 |
| VI. Conclusões.....   | 35 |
| Resumo.....   | 36 |
| Abstract.....   | 37 |
| Referências bibliográficas.....   | 38 |
| Apêndices   |    |
| Anexo 1.....  | 46 |
| Anexo 2.....  | 47 |
| Biografia.....  | 51 |

# Introdução

---

## 1. Comportamento social

O surgimento do comportamento social é, até hoje, uma questão controversa na Biologia Evolutiva e a seleção de parentesco tem sido uma das principais teorias utilizadas para explicá-lo (Eberhard, 1975). De acordo com essa teoria, inicialmente proposta por Hamilton (1964), ações sociais são favorecidas pela seleção natural se aumentam o *fitness* inclusivo do indivíduo que as realiza. Este é composto pelo *fitness* direto - impacto das ações do indivíduo sobre sua própria aptidão reprodutiva - e indireto - impacto das ações do indivíduo sobre o sucesso reprodutivo do parceiro social, multiplicado pelo coeficiente de parentesco entre ambos (Davies, Krebs & West, 1981). Dessa forma, a teoria de seleção de parentesco pode explicar relações sociais no nível do indivíduo e tem como componentes principais a variação no *fitness* inclusivo e o grau de parentesco entre os membros dos agrupamentos (Eberhard, 1975).

Sistemas sociais podem ter diferentes formas, desde simples agregados efêmeros de poucos indivíduos, até sociedades complexas (Raboski *et al.*, 2012). Apesar dessa diversidade, entre os vertebrados, a maior parte dos estudos tem focado em comportamentos sociais complexos, exibidos por espécies de aves e mamíferos, que normalmente requerem cuidado parental obrigatório e são mediados por pistas visuais e acústicas (Clark *et al.*, 2012; Davis *et al.*, 2010). Assim, tem se priorizado o conhecimento sobre a manutenção e funcionamento das sociedades e não sobre o seu surgimento (Raboski *et al.*, 2012), de forma que estudar espécies que apresentam sistemas sociais simples, facultativos e sem cuidado parental, como ocorre nos Squamata, pode ser fundamental para a compreensão da transição do modo de vida solitário para a vida em sociedade (Davis *et al.*, 2010).

## 2. Sistemas sociais em lagartos

Trabalhos que examinam a evolução de agrupamentos sociais nos Squamata e, especialmente, nos lagartos, foram deixados para trás por muitos anos, graças a ideia de que eles apresentariam sistemas sociais simples, com cuidado parental e cooperação limitados (Gardner *et al.*, 2016) e com a formação de agrupamentos efêmeros, associados aos períodos de reprodução ou de termo-regulação (Chapple & Keogh,

2006). Porém, mesmo esses simples agrupamentos podem evoluir em direção a níveis mais complexos de interação social (Amarello & Smith, 2012), podendo trazer contribuições para o entendimento da passagem da vida solitária para os sistemas sociais (Gardner *et al.*, 2016).

O estudo de sistemas sociais em lagartos começou a receber mais atenção graças à descoberta de agrupamentos estáveis em algumas espécies, muitas vezes compostos por indivíduos geneticamente aparentados (Chapple, 2003; Chapple & Keogh, 2006; Davis, 2011; Masters & Shine, 2003; O'Connor & Shine, 2003; Rabosky *et al.*, 2012; Werner *et al.*, 1987). Dentro da infra-ordem Gekkota, agrupamentos sociais foram observados nas famílias Spherodactylidae (de Oliveira, de Queiroz & Mesquita, 2014), Gekkonidae (Cooper, Caffrey & Vitt, 1985; Kearney *et al.*, 2001; Meyer & Mouton, 2007) e Phyllodactylidae (Lima, Passos & Borges-Nojosa, 2011; Righi, Galdino & Nascimento, 2004), mas foram descritos somente com base em evidências observacionais de campo, de forma que a relação genética entre os membros ainda não é conhecida no grupo (Barry, 2010).

Os núcleos familiares são considerados a forma mais simples e comum de agrupamento social e são caracterizados pela presença de adultos e jovens aparentados num mesmo local (Gardner *et al.*, 2016; Masters & Shine, 2003). Apesar de serem considerados comuns entre os lagartos, sua ocorrência só foi comprovada até o momento, através de estudos genéticos e moleculares, nas famílias Scincidae e Xantusiidae (Chapple, 2003; Davis, 2011; Davis *et al.*, 2010).

### **3. Marcadores moleculares**

A evolução das análises de maternidade e paternidade ocorreu de forma concomitante ao surgimento e emprego de novos marcadores moleculares. Iniciando nos anos 60 com o emprego de alozimas, a área passou por uma revolução com a descoberta dos microssatélites (Tautz, 1989).

Os microssatélites permanecem até a atualidade como um dos principais marcadores moleculares utilizados para análises de maternidade e paternidade por diversos fatores: serem codominantes, possuírem alto nível de polimorfismo, obedecerem a uma herança mendeliana e pelo fato de serem amplificados através reações em cadeia da polimerase (PCR) (Davies, Krebs & West, 1981). Assim, o marcador de escolha para este trabalho foram os microssatélites.

A utilização destes marcadores é dificultada pela falta de sequências disponíveis para organismos não-modelo, além do alto custo de desenvolvimento e dificuldades técnicas na criação das bibliotecas através das estratégias tradicionais de clonagem (Kang, Han & Park, 2015). Com o surgimento das técnicas de Sequenciamento de Nova Geração (NGS), tais obstáculos estão sendo superados, levando a uma maior produção de dados, por um custo mais baixo e de forma mais rápida (Yu *et al.*, 2011). Portanto, neste trabalho, optou-se pelo emprego de técnicas de NGS para a criação de bibliotecas de microsatélites.

#### **4. Técnicas empregadas em análises de maternidade e paternidade**

Tão importante quanto a escolha do marcador molecular adequado para o sistema estudado é a escolha da técnica adequada de análise de maternidade e paternidade. De acordo com Jones e colaboradores (2010), as técnicas disponíveis atualmente podem ser divididas em seis categorias diferentes: (1) exclusão; (2) atribuição categórica; (3) atribuição fracionada; (4) modelos de probabilidade total; (5) reconstrução parental e (6) reconstrução de grupos de irmãos.

Idealmente, com marcadores moleculares de alto poder de resolução e alto polimorfismo e com uma amostragem adequada da população, todas as técnicas resultariam no mesmo cenário. Porém, erros de genotipagem, presença de alelos nulos, desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg e desequilíbrio de ligação entre os loci, além de dificuldades técnicas na amostragem podem influenciar nos resultados obtidos dependendo da técnica escolhida (Jones *et al.*, 2010). Assim, é importante entender as vantagens e limitações de cada técnica ao realizar as análises.

A técnica de exclusão é a mais antiga empregada em estudos de maternidade e paternidade em espécies diploides (Jones & Arden, 2003). Partindo do pressuposto de que pais e filhotes vão compartilhar pelo menos um alelo em cada loci utilizado (Chakraborty, Shaw & Schull, 1974) qualquer incompatibilidade resulta em exclusão do candidato da lista de possíveis pais. É uma técnica útil nos casos em que parentes próximos dos filhotes estão na lista de possíveis pais e quando o número de filhotes é pequeno, menor do que 8-10 (Jones *et al.*, 2010). Porém, problemas surgem quando erros de genotipagem, alelos nulos e ocorrência de mutações levam à exclusão de pais verdadeiros. Assim, como uma tentativa de solucionar estas dificuldades, muitos

programas exigem incompatibilidade de pelo menos dois alelos para excluir um candidato (Jones & Arden, 2003).

Assim como a técnica de exclusão, as técnicas de atribuição categórica e fracionada são indicadas para os casos em que o objetivo é identificar a paternidade e/ou maternidade de um grupo focal de filhotes, dada uma lista de candidatos amostrados (Jones *et al.*, 2010). É a principal técnica utilizada nos casos em que a exclusão não pode ser realizada, podendo acomodar erros de genotipagem e mutações (Marshall *et al.*, 1998; Kalinowski *et al.*, 2007). A principal diferença, no entanto, reside na ideia de que diferentes genótipos parentais possuem probabilidades diferentes de gerar um genótipo no grupo de filhotes (Meagher & Thompson, 1986). Por exemplo, é muito mais provável que um alelo apresentado pelo filhote tenha sido herdado de um indivíduo que é homocigoto para este alelo do que de um indivíduo que é heterocigoto (Jones *et al.*, 2010). Através da utilização de diferentes equações, um valor logarítmico de probabilidade (“logarithm of the odds” ou LOD) é calculado a partir da razão entre a probabilidade de um indivíduo ser o pai do filhote e a probabilidade de ambos os indivíduos não serem relacionados geneticamente (Jones & Arden, 2013). Após uma análise de todos os possíveis genótipos dos pais, cada candidato recebe um valor de LOD e, aquele com maior valor, é indicado como o mais provável pai ou mãe do filhote (Jones & Arden, 2013). Esta técnica pode ser utilizada em casos em que a mãe é conhecida e o objetivo é identificar o pai, quando o oposto é verdadeiro ou ainda quando nenhum dos pais é conhecido *a priori* (Jones *et al.*, 2010).

A diferença entre a atribuição categórica e fracionada é que no primeiro método, o filhote é atribuído para o mais provável pai, enquanto que no segundo método o filhote é “dividido” entre todos os pais compatíveis (Jones & Arden, 2013). Dessa forma, enquanto a atribuição categórica se aproxima mais à realidade biológica, pois cada filhote tem somente um pai ou mãe, a atribuição fracionada é útil na estimativa de proporção de filhotes gerados por cada pai quando observamos a população como um todo (Devlin *et al.*, 1988).

Ao lado das técnicas de exclusão e atribuição, os modelos de probabilidade total têm aparecido como uma opção promissora. Este método, assim como a atribuição fracionada, estima relações de maternidade e paternidade considerando a população como um todo e permite a inserção de informações ecológicas conhecidas *a priori* sobre a espécie, como a localização espacial dos indivíduos e dados comportamentais,

como a existência de dominância ou territorialidade (Hadfield, Richardson & Burke, 2006). A principal desvantagem desta técnica é justamente a necessidade de informações sobre ecologia comportamental, que normalmente não são conhecidas para a maior parte das espécies estudadas. Assim, sua utilização é indicada somente para sistemas já extensivamente estudados (Jones *et al.*, 2010).

Por fim, as técnicas de reconstrução parental e reconstrução de grupos de irmãos focam na utilização do genótipo da prole para inferir o genótipo dos pais. No primeiro caso, a prole é amostrada em conjunto, o que permite, através de uma análise de alelos compartilhados entre os filhotes, reconstruir o genótipo dos pais daquele grupo. Por outro lado, a reconstrução de grupos de irmãos é adotada quando nenhum parental foi amostrado e não é possível reconhecer a priori se o grupo de filhotes é composto por irmãos ou meio-irmãos (Ashley *et al.*, 2009). Estas técnicas são indicadas em casos em que não é possível coletar adultos candidatos à paternidade e maternidade e se a prole for formada por um grande número de filhotes (Jones *et al.*, 2010).

## **5. Considerações sobre a espécie de estudo: *Gymnodactylus amarali***

Dentre os membros da família Phyllodactylidae, o gênero *Gymnodactylus* é endêmico da América do Sul. São animais pequenos (cerca de 5 cm de corpo), em sua maioria noturnos, terrestres, crípticos e possuem estratégia do tipo “senta-e-espera” de predação (Vanzolini 1953, 1982). Dentre as espécies deste gênero, *Gymnodactylus amarali* Barbour, 1925 (Figura 1), recentemente considerada um complexo de espécies crípticas (Domingos *et al.*, 2014), é característica de campos rupestres espalhados pelo Cerrado brasileiro. Se alimentam majoritariamente de cupins, além de pequenos invertebrados, e as fêmeas produzem normalmente 2 ovos por ciclo reprodutivo. São geralmente encontrados em micro-habitats distintos, como dentro de cupinzeiros e sob rochas ou troncos caídos e.



**Figura 1:** Indivíduo de *Gymnodactylus amarali* encontrado no interior de um cupinzeiro na Estação Ecológica Serra Geral do Tocantins (EESGT). Foto tirada por Mauro Teixeira Jr.

Em estudo recente, feito com duas populações de *G. amarali*, coletados na Estação Ecológica Serra Geral do Tocantins (EESGT), descobriu-se que, na linhagem de animais que habitavam o interior de cupinzeiros (Figura 1), não havia variação genética para ambos os marcadores mitocondriais utilizados (Citocromo B e 16S), indicando alta proximidade entre os indivíduos desse micro-habitat quando comparados com os indivíduos de habitat rochoso das proximidades. Além disso, após sexagem e classificação do nível de maturidade sexual, descobriu-se que, em cada cupinzeiro, haviam pequenos grupos normalmente formados por machos e fêmeas sexualmente maduros e indivíduos jovens (Magalhães, 2016). Dessa forma, este trabalho procura dar continuidade a tais descobertas, investigando a possível relação de paternidade e maternidade entre os membros desses agrupamentos, de forma inédita na infra ordem Gekkota e na família Phyllodactylidae.

## Objetivos

---

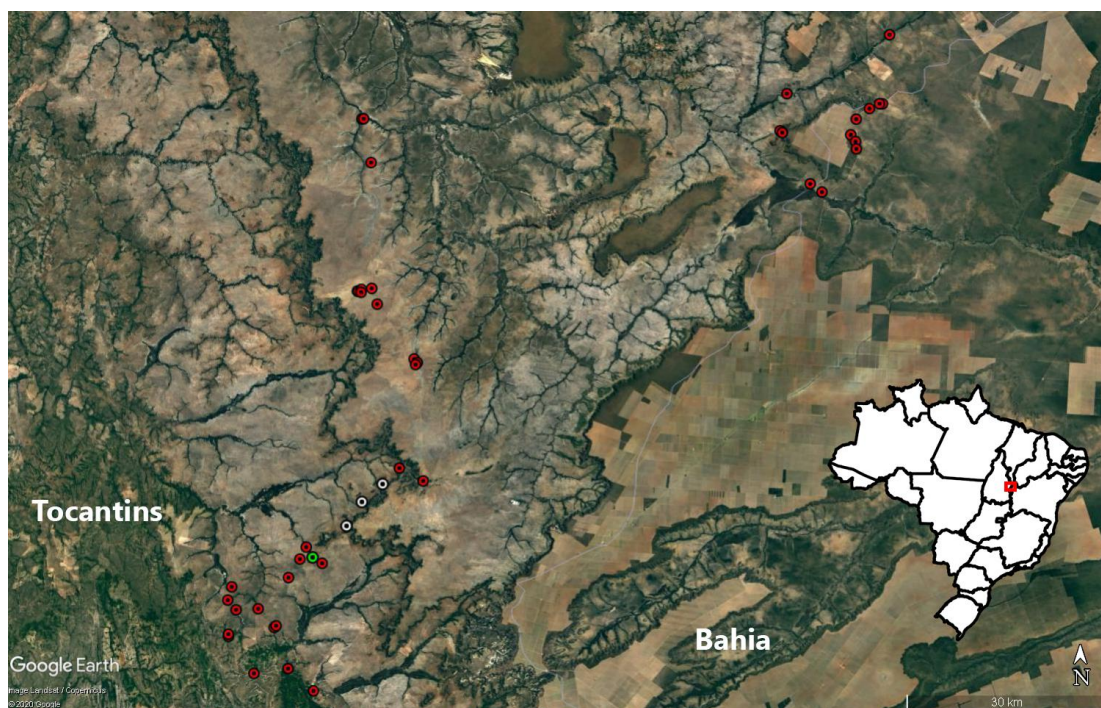
Os objetivos deste trabalho foram:

- Identificar microssatélites polimórficos para a espécie *Gymnodactylus amarali*, através de técnicas de sequenciamento de nova geração;
- Utilizando os marcadores encontrados, atribuir aos indivíduos juvenis os mais prováveis pais dentro da população;
- Analisar a relação de maternidade e paternidade entre indivíduos encontrados no interior de cada um dos cupinzeiros e entre indivíduos provenientes de cupinzeiros distintos.

## Materiais e Métodos

### 1. Área e métodos de coleta

Os espécimes utilizados neste trabalho foram coletados entre 27 de janeiro e 4 de fevereiro de 2008, na porção sul da Estação Ecológica Serra Geral do Tocantins (EESGT), no município de Almas (TO) (Figura 2). Além deste, a EESGT engloba os municípios de Ponte Alta do Tocantins, Mateiros e Rio da Conceição, no Tocantins, e de Formosa do Rio Preto, na Bahia, totalizando uma área aproximada de 707 mil hectares (ICMBIO). Em conjunto com outras Unidades de Conservação, a EESGT compõe o Corredor Ecológico da Região do Jalapão, integrando o maior conjunto de áreas protegidas no Cerrado (Cavalcanti & Joly, 2002).



**Figura 2:** Área de estudo na região do Jalapão. Símbolos vermelhos: pontos amostrados; Símbolos Brancos: pontos de coleta de *Gymnodactylus* em áreas rochosas, Ponto Verde: ponto de coleta de *Gymnodactylus* em cupinzeiro, em campo úmido.

Os 43 indivíduos foram coletados através de coleta manual ativa no interior de cupinzeiros encontrados em áreas de solo arenoso, parcialmente exposto, próximas a campos úmidos e veredas na região sul da EESGT (Recoder *et al.*, 2011), no ponto

verde indicado no mapa. Os cupinzeiros amostrados foram numerados, identificando os animais encontrados em cada um (Tabela 1).



**Figura 3:** Visão geral da vereda e campo úmido na área amostrada (topo), exemplos de cupinzeiros amostrados (embaixo à esquerda) e galerias dos cupinzeiros expostas onde os *Gymnodactylus* eram encontrados (embaixo à direita). Fotos tiradas por Mauro Teixeira Jr.

Os exemplares foram eutanasiados com injeção de lidocaína e amostras de fígado ou fragmentos da cauda foram coletados, preservados em etanol absoluto e depositadas no Banco de Tecidos do Laboratório de Herpetologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo. Os animais foram então preservados em formol 10%, transferidos para etanol 70% e incorporados à coleção herpetológica do mesmo laboratório.

Análises morfológicas foram feitas, determinando o sexo de cada indivíduo amostrado através da observação da morfologia interna das gônadas. Além da presença dos órgãos reprodutivos, foi possível a identificação da maturidade sexual dos

indivíduos observando a presença de testículos desenvolvidos e túbulos seminíferos enovelados nos machos e de folículos vitelogênicos, *corpora lutea* ou ovos ovidutais nas fêmeas (Colli *et al.*, 2003; Magalhães, 2016).

Tabela 1. Registro do número de fêmeas (F), machos (M) e juvenis (J) amostrados em cada cupinzeiro.

| Cupinzeiro | F | M | J |
|------------|---|---|---|
| 1          | - | 1 | 2 |
| 2          | 2 | 1 | 1 |
| 4          | - | - | 2 |
| 5          | 1 | - | 3 |
| 6          | 1 | 1 | 1 |
| 7          | 1 | 1 | 1 |
| 8          | 1 | 1 | 1 |
| 9          | 3 | 2 | 1 |
| 10         | - | 1 | - |
| 12         | 1 | 1 | 2 |
| 13         | 1 | 2 | - |
| 14         | 2 | 1 | 1 |
| 15         | 1 | 1 | 1 |

## 2. Estudo Molecular

### 2.1. Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada utilizando o kit *Wizard® Genomic DNA Purification, Promega*. Um fragmento do tecido de cada indivíduo foi retirado e pressionado contra papel absorvente até a eliminação completa do etanol. Em cada tubo contendo o tecido, foi adicionado 300µl de *Solução de Lise Nuclear* e 5µl de *Proteinase-K* (20mg/ml). A mistura foi deixada em estufa a 65°C até a completa digestão dos tecidos. Depois, foi deixada para resfriar à temperatura ambiente e adicionou-se 300µl de acetato de amônia, sendo misturada em vortex logo em seguida. Os tubos foram então colocados em gelo por 30 minutos e centrifugados à 13.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 600µl de Isopropanol e a mistura foi feita por inversão. Novamente, o tubo foi colocado em centrífuga por 10 minutos em velocidade máxima e o sobrenadante foi então descartado. Adicionou-se ao tubo 600µl de etanol 70%, seguindo-se de mais uma centrifugação de 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e a amostra foi deixada

para secar à temperatura ambiente até estar completamente livre do etanol. Por fim, adicionou-se 50µl de *Solução de Reidratação de DNA* em cada tubo. A quantificação foi realizada em um espectrofotômetro *NanoDrop 2000* (Thermo Scientific). Para as reações de PCR o DNA de cada indivíduo foi diluído para a concentração de 20ng/µl.

## **2.2. Identificação de loci de microssatélites a partir de sequenciamento de nova geração.**

O serviço de sequenciamento de nova geração foi realizado pelo Centro de Genômica Funcional da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) da Universidade de São Paulo, São Paulo. A qualidade do DNA dos indivíduos coletados foi testada inicialmente através de eletroforese em gel de agarose 2% e posteriormente foi realizada a quantificação do DNA com o equipamento Qubit fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Para a preparação da biblioteca, 50 ng de DNA de um dos indivíduos (MTR14637) foi utilizado, de acordo com o protocolo do kit Nextera DNA (Illumina). O sequenciamento foi realizado utilizando o kit MiSeq v2 500 ciclos (Illumina, Inc., San Diego, CA) com sequenciamento bi-direcional (*paired-end*; 2x250 ciclos).

Os dados obtidos foram analisados pelo Centro de Genômica Funcional utilizando o programa Real Time Analysis (fornecido pela Illumina), identificando as bases nas imagens do sequenciamento e convertendo-as em sequências no formato fastq. A cada base foi então assinalado um valor Phread de qualidade (Ewing & Green, 1998) e a avaliação inicial das leituras foi feita com o programa FastQC versão 0.11.5 (Andrews, 2010). A filtragem das sequencias de adaptadores e das bases com baixa qualidade (qualidade mínima de 10 e média mínima de qualidade por leitura de 15) foi feita com o programa BBDuk, do pacote BBTools versão 37.50 (<http://jgi.doe.gov/data-and-tools/bbtools/>). Por fim, leituras com menos de 75 pares de bases e seus respectivos pares também foram excluídas da análise, preservando o pareamento correto do sequenciamento.

Para a montagem do rascunho do genoma da espécie, foi utilizado o software MEGAHIT versão 1.1.2 (Li *et al.*, 2015). As montagens foram feitas com tamanhos de kmer de 21 a 71, em incrementos de 10, além de uma montagem com kmer de 75. Os rascunhos intermediários obtidos foram então condensados em um rascunho final do genoma da espécie.

A busca por sequências de microssatélites foi feita utilizando o programa MISA versão 1.0 (Thiel *et al.*, 2003) e os parâmetros utilizados foram repetições perfeitas, com pelo menos 7 repetições para di-nucleotídeos, e 5 repetições para tri-, tetra-, penta-, hexa- e hepta-nucleotídeos. Utilizou-se então o programa Primer3 versão 1.1.4 (Rozen & Skaletsky, 2000) para desenhar primers flanqueando as regiões identificadas.

Ao final das análises foi obtido um total de 78.419 loci de microssatélites perfeitos para a espécie, com 35.356 di-nucleotídeos, 22.373 tri-nucleotídeos, 19.131 tetra-nucleotídeos, 1.093 penta-nucleotídeos, 452 hexa-nucleotídeos e 14 hepta-nucleotídeos. Destes, foi possível o desenho de primers para um total de 42.521 loci, distribuídos entre 17.496 di-nucleotídeos, 14.370 tri-nucleotídeos, 10.013 tetra-nucleotídeos, 536 penta-nucleotídeos, 103 hexa-nucleotídeos e somente 3 hepta-nucleotídeos.

A escolha de primers para genotipagem seguiu critérios recomendados por Gardner e colaboradores (2011). Assim, foram priorizadas sequências com repetições de di-nucleotídeos, por serem altamente polimórficos, ainda que normalmente apresentem mais ruído em sequenciamento, e de tri-nucleotídeos, que normalmente apresentam menor ruído. Além disso, foram escolhidos produtos com tamanho aproximado de 150 e 250 pares de bases, primers que tivessem alta proporção CG/AT e não possuíssem repetições de um nucleotídeo em sua sequência. Foram inicialmente sintetizados 23 pares de primers, sendo 14 de microssatélites com di-nucleotídeos e 9 com tri-nucleotídeos (Anexo 1).

### **2.3. Genotipagem dos indivíduos**

Diversos experimentos de PCR foram realizados para a otimização dos protocolos de amplificação. Os testes iniciais foram feitos utilizando o DNA de dois indivíduos da espécie (MTR 14641 e MTR 14651), em reações em gradiente de temperatura variando de 54°C a 64°C, de acordo com as temperaturas sugeridas pelo programa Primer3 versão 1.1.4 (Rozen & Skaletsky, 2000).

O volume de reação foi de 10µl, contendo 5,375µl de água Milli Q, 1µl de DNA (20 ng), 1µl de tampão, 0,75µl de MgCl<sub>2</sub> (2,5 mM), 0,5µl de DNTPs (2 uM), 0,5 µl de primer M13 (5µM) marcado com fluorescência (FAM, HEX ou NED, Applied Biosystem), 0,5µl do mix de primers (0,5µM do primer forward modificado com a

cauda M13 e 5 $\mu$ M do primer reverse) e 0,125 $\mu$ l de *Taq DNA Polimeras Recombinant (Fermentas)* (0,06 U).

O programa geral utilizado nos termocicladores foi de desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos com 30 segundos de desnaturação a 95°C, 30 segundos de hibridação a temperaturas em gradiente, variando de 54°C a 64°C, 30 segundos de extensão a 72°C e um ciclo de extensão final a 72°C por 15 minutos, com a finalização a 4°C.

Os resultados da PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 2%, corados com *GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain* (Biotum). Reações que produziram com sucesso bandas limpas e do tamanho esperado foram repetidas utilizando o DNA dos 43 indivíduos coletados e com a temperatura adequada.

Após verificação da qualidade da PCR de todas as amostras em eletroforese em gel de agarose 2%, foi feito o preparo para a genotipagem, acrescentando 8 $\mu$ l de uma mistura contendo 7,9 $\mu$ l de formamida Hi-Di e 0,1 $\mu$ l do marcador de peso molecular GeneScan-500 ROX (Applied Biosystem) à alíquota de 2 $\mu$ l de cada uma das amostras amplificadas diluídas. As amostras foram então analisadas no sequenciador *ABI Prism Genetic Analyser* (3500) do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo.

Os resultados obtidos a partir da genotipagem foram analisados utilizando o programa Geneious 6.1. (<https://www.geneious.com>). Com o plugin Geneious Microsatellite Plugin, específico para análise de microssatélites, foi possível identificar visualmente o tamanho dos diferentes alelos dos loci testados. A partir destes valores, foi manualmente montada uma tabela de genótipos e erros na genotipagem foram avaliados utilizando o programa MicroChecker 2.2.3 (van Oosterhout *et al.*, 2004). O teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg foi realizado no programa Genepop on the Web 4.7.5. (Raymond & Rousset, 1995; Rousset, 2008), com base na frequência de heterozigotos esperada e observada. Também utilizando este mesmo programa foi realizado o teste de ocorrência de equilíbrio de ligação a partir da construção de tabelas de contingência para todos os pares de microssatélites.

### **3. Análises de maternidade e paternidade**

A técnica utilizada para a análise de maternidade e paternidade entre os indivíduos de *G. amarali* foi escolhida com base no fluxograma apresentado por Jones

e colaboradores (2010). A possibilidade de coletar indivíduos adultos que são candidatos à paternidade e maternidade dos filhotes e o conhecimento limitado sobre a ecologia comportamental da espécie, aliada à possibilidade de acomodar possíveis erros de genotipagem, fazem com que a técnica mais adequada para a análise de maternidade e paternidade neste caso seja a atribuição categórica.

As análises foram então conduzidas utilizando o programa CERVUS 3.0.7 (Kalinowski *et al.*, 2007), que utiliza dados de marcadores co-dominantes, como microssatélites, assumindo que a espécie seja diploide e que os marcadores sejam autossômicos e estejam em equilíbrio de ligação. A partir dos genótipos, foram então realizadas três análises: frequência alélica, simulação de análise de maternidade e paternidade e, finalmente, a própria análise de maternidade e paternidade.

### **3.1. Análise de frequência alélica**

Com a análise de frequência alélica foi calculada a heterozigose esperada (Nei, 1987), conteúdo de informação polimórfica (PIC) (Botstein *et al.*, 1980; Hearne, Ghosh & Todd, 1992), probabilidade de não-exclusão em casos em que um ou os dois genótipos dos pais são desconhecidos (Jamieson & Taylor, 1997; Marshall *et al.*, 1998) e probabilidade de que o genótipo em um locus não varie entre dois indivíduos não relacionados e entre dois irmãos (Waits, Luikart & Taberlet, 2001). Usando como base as frequências alélicas observadas e esperadas, foi calculada uma estimativa de frequências de alelos nulos em cada um dos loci estudados (Summers & Amos, 1997).

### **3.2. Simulação da análise de maternidade e paternidade**

A simulação de análise de maternidade e paternidade realizada pelo programa CERVUS 3.0.7 tem como objetivo estimar o poder de resolução dos loci estudados com base nas frequências alélicas e estimar valores críticos de LOD de forma que a confiança na identificação das relações possa ser avaliada estatisticamente (Kalinowski *et al.*, 2007).

A simulação se inicia quando o arquivo de frequências alélicas gerado na análise anterior é utilizado na geração de genótipos fictícios de um casal de pais e, por herança mendeliana, na geração do genótipo de seus filhotes. Além destes, uma série de genótipos de adultos não relacionados também são gerados.

Os dados de genótipo de todos os indivíduos são então alterados para acomodar possíveis erros nos dados reais de genótipos da população estudada ou mesmo na própria amostragem destes animais na natureza. Os parâmetros que podem ser alterados para acomodar estes erros são: número de possíveis mães e pais dentro do total de animais amostrados, proporção de mães e pais amostrados na população, considerando que normalmente não é possível coletar 100% da população na natureza, e proporção de loci com erros de genotipagem (Marshall *et al.*, 1998).

Na simulação feita para os indivíduos de *G. amarali*, foram consideradas 14 possíveis mães e 13 possíveis pais, com base no número de animais de ambos os sexos sexualmente maduros à época da coleta (Magalhães, 2016). Além disso, levando em conta o processo de coleta, o isolamento dos cupinzeiros na região de estudo e o próprio modo de vida destes animais, é provável que grande parte dos adultos desta população tenham sido amostrados, assim a proporção de mães e pais coletados utilizada na simulação foi de 80%. Por fim, com relação a erros de genotipagem, foi utilizado o valor padrão do programa (1%), considerando que em análise anterior, realizada no programa MicroChecker 2.2.3 (van Oosterhout *et al.*, 2004), não foram indicados erros nos loci utilizados.

Após incluir as taxas de erro, o programa conduz uma série de análises de maternidade e paternidade, identificando o mais provável casal de pais para cada filhote fictício, podendo ou não coincidir com o casal de pais verdadeiro. Os valores de LOD são registrados e um valor crítico é determinado após a comparação entre casos de erro e acerto na identificação dos pais verdadeiros. Dessa forma, quando a análise de maternidade e paternidade for realizada com os dados reais, se um candidato possui um LOD mais alto do que o valor crítico estabelecido na simulação, a relação de parentesco pode ser determinada com 95% (critério rigoroso) ou 80% (critério relaxado) de confiança (Marshall *et al.*, 1998).

Além do LOD, o programa também utiliza o valor delta ( $\Delta$ ), que é a diferença entre o valor de LOD entre o primeiro e o segundo candidato mais provável à paternidade/maternidade (Marshall *et al.*, 1998). Os valores de LOD e  $\Delta$  variam de 999 para ambos, em caso de marcadores com baixo poder de resolução, a -999 para LOD ou 0 para  $\Delta$ , caso os marcadores possuam alto poder de resolução (Kalinowski *et al.*, 2007).

### 3.3. Análise de maternidade e paternidade

Com os resultados da análise de frequência alélica e das simulações realizadas, foi feita a análise de identificação de possíveis pais dos 16 indivíduos juvenis de *G. amarali*. Os adultos foram divididos de acordo com o sexo, com 14 fêmeas e 13 machos, todos sexualmente maduros e considerados possíveis pais para os filhotes.

O programa realiza diversos tipos de análise de parentesco, como análise de paternidade, maternidade ou a análise do casal de pais mais provável para o filhote. Esta é a mais indicada quando nenhum dos pais é conhecido *a priori* e, portanto, foi a escolhida para o presente estudo.

Analisando cada filhote separadamente, o programa calcula o valor de LOD para todos casais de possíveis pais. Se o valor for maior que o LOD crítico calculado na simulação, o filhote é atribuído ao casal. Se o valor de LOD não for alto suficiente, significa que não é possível realizar a atribuição com os níveis de confiança escolhidos na simulação, de 95% e 80%. Os resultados podem incluir o mais provável casal de pais ou todos os pais com LOD positivo, ainda que este valor seja menor que o valor crítico estimado (Kalinowski *et al.*, 2007).

## Resultados

### 1. Isolamento de microssatélites específicos e genotipagem dos indivíduos

Dentre os 23 loci de microssatélites selecionados para os testes de amplificação, 15 não puderam ser analisados devido à amplificação inespecífica ou inexistente para todos ou alguns indivíduos. Entre os 8 microssatélites restantes, somente um foi monomórfico (GD21) e os demais se mostraram polimórficos, contendo de 3 a 6 alelos para os 43 indivíduos testados (Tabela 2).

Tabela 2. Primers específicos para a espécie *Gymnodactylus amarali*. Nome do microssatélite (Micro), unidade de repetição, sequências dos primers, tamanho esperado do produto, fluoróforo utilizado, temperatura de hibridação (Th) e número de alelos encontrados (Na).

| Micro | Repetição           | Primers (5'-3')  | Tamanho do produto (pb) | Fluoróforo | Th   | Na |
|-------|---------------------|--|-------------------------|------------|------|----|
| GD04  | (GA) <sub>11</sub>  | F: 5'-CCAGGAACACTACGCCACTGAG-3'<br>R: 5'-TTCTGCCAATTCATGAGCAC-3' | 130                     | FAM        | 64°C | 5  |
| GD07  | (GT) <sub>12</sub>  | F: 5'-AGTGAGTTCGACACCCTGC-3'<br>R: 5'-TGCAGCATGCTACCTGTTGT-3'    | 132                     | HEX        | 64°C | 4  |
| GD08  | (GT) <sub>13</sub>  | F: 5'-GGAGCAAAGTTGCAAACCTC-3'<br>R: 5'-GTTGCCAGCTGAGGATAAGC-3'   | 132                     | NED        | 64°C | 6  |
| GD09  | (TC) <sub>10</sub>  | F: 5'-GCAGGGAGATTCAGGTTTG-3'<br>R: 5'-GTGGATTGAACGCTGTTTGA-3'    | 136                     | FAM        | 64°C | 3  |
| GD13  | (TC) <sub>17</sub>  | F: 5'-GAAATGCGTTCAGTTCAGC-3'<br>R: 5'-ACCAGAATGGCTTCAGACGA-3'    | 221                     | NED        | 64°C | 4  |
| GD14  | (AC) <sub>14</sub>  | F: 5'-ATCTGCATAGGATTGCCCTG-3'<br>R: 5'-GCCTACTGTTAGGGTTGCCA-3'   | 251                     | FAM        | 64°C | 5  |
| GD15  | (CTC) <sub>10</sub> | F: 5'-ATGCTCATCCAGATCCAAGC-3'<br>R: 5'-AGGATACATGCGGTTCCAAG-3'   | 139                     | HEX        | 64°C | 6  |
| GD21  | (AGC) <sub>10</sub> | F: 5'-CACATCCGCACCATTTACTG-3'<br>R: 5'-CAGTCAGAAATCTGCAGCCA-3'   | 231                     | NED        | 60°C | 1  |

As análises realizadas indicaram a presença de erros de genotipagem no locus GD09, devido ao excesso significativo de homozigotos e alelos com somente uma unidade de repetição de diferença. Possivelmente os erros foram resultado de ruído gerado no sequenciamento. Este locus, assim como os loci GD04 e GD08, mostraram-se em desequilíbrio de ligação e, portanto, foram retirados da análise. Assim, quatro microssatélites específicos foram utilizados para as análises de maternidade e paternidade.

### 2. Análises de maternidade e paternidade

## 2.1. Análise de frequência alélica

O número de alelos identificados para os 43 indivíduos amostrados variou de 4 a 6 dependendo do locus, com uma média de alelos por locus de 4,75 nos quatro loci utilizados. A heterozigosidade média esperada foi de 0,6430 e a média de conteúdo de informação polimórfica foi de 0,5932 para todos os loci.

A análise indicou ainda a presença de alelos nulos no locus GD07, com uma frequência estimada de 0,1167. O programa trata a presença de alelos nulos como se fossem erros de genotipagem, sugerindo a não utilização de um locus em caso de alto valor de frequência de alelos nulos ( $> 0,05$ ). Dessa forma, o locus GD07 também foi retirado das análises. Ao retirar este locus da análise de frequências alélicas, o número médio de alelos por locus passou para 5, a heterozigosidade média esperada e observada passaram a ser 0,6320 e 0,6243, respectivamente, e a média de conteúdo de informação polimórfica passou a ser 0,5847.

Com relação às probabilidades médias de não-exclusão, os resultados obtidos foram: 43,71% de probabilidade de que o grupo de loci falhe na exclusão de um candidato à paternidade ou maternidade não relacionado ao filhote; 20,46% de que o grupo de loci falhe na exclusão de um candidato, dado que o genótipo do parental do sexo oposto é conhecido; e somente 6,73% de que o grupo de loci falhe na exclusão de um casal de pais não relacionado ao filhote. Por fim, a probabilidade média de que os loci falhem na diferenciação de dois indivíduos escolhidos ao acaso é de 0,5% e a probabilidade média de que os loci falhem na diferenciação entre dois irmãos selecionados ao acaso é de 11,04%.

Tabela 3. Resultado da análise de frequência alélica utilizando o programa CERVUS 3.0.7. Nome do microsatélite (Micro), número de alelos (Na), heterozigosidade esperada (He), heterozigosidade observada (Ho), conteúdo de informação polimórfica (PIC), probabilidade média de não-exclusão de um candidato à paternidade/maternidade que não seja relacionado ao filhote (NE-1P), probabilidade média de não-exclusão de um candidato não relacionado, dado que o genótipo do segundo parental é conhecido (NE-2P), probabilidade média de não-exclusão de um casal de pais não relacionado ao filhote (NE-PP), probabilidade média de não-diferenciação entre dois indivíduos selecionados ao acaso (NE-I) e probabilidade média de não-diferenciação entre dois irmãos selecionados ao acaso (NE-SI).

| Micro        | Na   | He     | Ho     | PIC    | NE-1P  | NE-2P  | NE-PP  | NE-I   | NE-SI  |
|--------------|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| GD13         | 4    | 0,6711 | 0,6512 | 0,6044 | 76,21% | 60,07% | 43,14% | 13,23% | 46,14% |
| GD14         | 5    | 0,4651 | 0,4419 | 0,4380 | 88,30% | 72,20% | 54,49% | 31,36% | 59,85% |
| GD15         | 6    | 0,7598 | 0,7674 | 0,7116 | 64,97% | 47,18% | 28,67% | 10,13% | 39,99% |
| <b>Média</b> | 4,75 | 0,6320 | 0,6243 | 0,5847 | 43,71% | 20,46% | 6,73%  | 0,5%   | 11,04% |

## **2.2. Simulação de análise de maternidade e paternidade**

A simulação de análise de maternidade e paternidade foi feita com os loci GD13, GD14 e GD15 e foram realizadas 100.000 simulações de testes de paternidade. Considerando um nível de confiança de 95% na determinação dos verdadeiros pais, o valor crítico de LOD deve ser no mínimo 9,99 para o casal. Ou seja, para que dois adultos sejam considerados como os verdadeiros pais do filhote, com 95% de confiança, o valor de LOD do casal deve ser maior que 9,99 após análise com os genótipos reais dos filhotes amostrados da espécie. Se o nível de confiança na determinação dos pais for de 80%, o valor crítico desce para 7,55. Com relação ao valor crítico de delta, considerando-se 95% de confiança, o valor foi de 6,94 e, considerando-se 80% de confiança, o valor foi 4,79.

Entre os 100.000 testes de paternidade simulados, somente 15 resultaram na identificação correta dos pais levando em conta um nível de confiança de 95%. Ao reduzir o nível de confiança para 80%, o número de identificações corretas subiu para 683. No entanto, para cerca de 99% dos testes não foi possível identificar os pais do filhote.

## **2.3. Análise de maternidade e paternidade**

No total, 267 casais obtiveram um valor de LOD positivo (Anexo 2) e, portanto, não foram excluídos como possíveis pais dos filhotes. O número de possíveis pais variou de 1 a 57 entre os filhotes: para o filhote MTR14605, coletado no cupinzeiro número 4, somente um casal de pais aparece com valor de LOD positivo, enquanto que para o filhote MTR14609, coletado no cupinzeiro 2, foram encontrados 57 possibilidades (Tabela 4).

Tabela 4. Número total de casais com valor de LOD positivo mantidos como possíveis pais dos filhotes identificados. Identificação dos filhotes (Filhote Id.) e número total de casais com LOD positivo.

| <b>Filhote Id.</b> | <b>Número total de casais com LOD positivo</b> |
|--------------------|--|
| MTR 14610          | 6  |
| MTR 14611          | 4  |
| MTR 14609          | 57   |
| MTR 14605          | 1  |
| MTR 14607          | 3  |
| MTR 14637          | 3  |
| MTR 14639          | 8  |
| MTR 14640          | 44   |
| MTR 14643          | 23   |
| MTR 14645          | 18   |
| MTR 14649          | 36   |
| MTR 14656          | 21   |
| MTR 14698          | 24   |
| MTR 14700          | 5  |
| MTR 14709          | 12   |
| MTR 14805          | 2  |

Na lista de possíveis pais (Anexo 2), foram identificados alguns casais que eram do mesmo cupinzeiro que os filhotes, como no caso dos filhotes MTR 14609, MTR 14643, MTR 14649 e MTR 14646. Em outros casos, somente candidatas à maternidade eram provenientes do mesmo cupinzeiro e, no caso do filhote MTR14611, um dos candidatos à paternidade também foi coletado no mesmo cupinzeiro. No entanto, para oito filhotes, os adultos que viviam no mesmo cupinzeiro foram excluídos da lista de possíveis pais. Além disso, para todos os filhotes também foram indicados possíveis pais que eram de outros cupinzeiros (Tabela 5).

Tabela 5. Distribuição dos candidatos à maternidade e paternidade de cada filhote em relação ao cupinzeiro onde foram coletados.

| <b>Filhote Id.</b> | Número de candidatas à maternidade encontradas no mesmo cupinzeiro que o filhote | Número de candidatas à maternidade encontradas em outros cupinzeiros | Número de candidatos à paternidade encontrados no mesmo cupinzeiro que o filhote | Número de candidatos à paternidade encontrados em outros cupinzeiros |
|--------------------|--|--|--|--|
| MTR 14610          | 0  | 6  | 0  | 1  |
| MTR 14611          | 0  | 2  | 1  | 1  |
| MTR 14609          | 2  | 10   | 1  | 9  |
| MTR 14605          | 0  | 1  | 0  | 1  |
| MTR 14607          | 0  | 3  | 0  | 1  |
| MTR 14637          | 1  | 0  | 0  | 3  |
| MTR 14639          | 0  | 2  | 0  | 7  |
| MTR 14640          | 0  | 9  | 0  | 7  |
| MTR 14643          | 1  | 6  | 1  | 4  |
| MTR 14645          | 0  | 6  | 0  | 3  |
| MTR 14649          | 1  | 5  | 1  | 6  |
| MTR 14656          | 1  | 6  | 2  | 2  |
| MTR 14698          | 1  | 8  | 0  | 4  |
| MTR 14700          | 0  | 1  | 0  | 1  |
| MTR 14709          | 1  | 5  | 0  | 2  |
| MTR 14805          | 0  | 2  | 0  | 1  |

No entanto, utilizando os três microssatélites obtidos, não foi possível verificar com 95% ou 80% de confiança a paternidade ou maternidade dos indivíduos estudados, pois o valor crítico de LOD não foi atingido por nenhum casal.

## Discussão

---

### 1. Identificação de microssatélites específicos através de NGS

A utilização de técnicas de Sequenciamento de Nova Geração (NGS) tem revolucionado o campo da ecologia molecular, permitindo o desenvolvimento de forma mais rápida e barata de diferentes marcadores utilizados nessa área de conhecimento. A combinação do elevado número de dados obtidos e de análises de bioinformática tem diminuído o tempo de laboratório na montagem de bibliotecas de microssatélites (Gardner *et al.*, 2011).

Em estudo realizado por Lance e colaboradores (2013) com 32 espécies de seis filos diferentes, foi encontrada uma média de 128 mil loci de microssatélites utilizando técnicas de NGS. Com relação aos répteis estudados pelos autores (*Lampropeltis getula*, *Sceloporus getula* e *Batagur trivittata*) a média aproximada de loci encontrados foi de 135 mil, com números variando de 245 mil loci para a serpente *Lampropeltis getula* e 22 mil loci para o quelônio *Batagur trivittata*. O número de microssatélites encontrados para a espécie *Gymnodactylus amarali* neste trabalho, de aproximadamente 78 mil loci, está em consonância com estes altos valores.

Este número é em parte reduzido quando consideramos somente loci para os quais os programas utilizados conseguem identificar primers nas regiões flangeadoras (Gardner *et al.*, 2011). Assim, a partir dos 78 mil loci descobertos foram desenhados primers para um total de 42.521 loci. No entanto, ao contrário do que foi verificado por Gardner e colaboradores (2011), o número de loci para os quais foi possível o desenho de primers foi maior no caso de microssatélites com repetições de di-nucleotídeos do que para microssatélites com tri-, tetra- ou penta-nucleotídeos.

Entre os 23 microssatélites escolhidos inicialmente para a genotipagem, 15 não puderam ser utilizados devido à amplificação inespecífica ou inexistente de todos ou alguns dos indivíduos amostrados. Como discutido por Gardner e colaboradores (2011), entre os passos de identificação dos loci de microssatélites e a seleção final de microssatélites polimórficos para uma espécie, há um grande esforço laboratorial de testagem e um alto número inicial de microssatélites é necessário.

O número elevado de microssatélites e primers obtidos através de técnicas de NGS implica na necessidade dos pesquisadores em priorizar certos critérios para escolher quais loci serão levados adiante nas análises (Gardner *et al.*, 2011). Um dos

aspectos importantes para essa escolha é a própria utilização de diferentes classes de repetições, uma vez que cada classe possui vantagens e desvantagens específicas. No presente trabalho, priorizou-se a utilização de di- e tri- nucleotídeos, devido ao alto teor de polimorfismo e menor ruído na análise dos genótipos, respectivamente. Porém, como previsto por Gardner e colaboradores (2011), a genotipagem de di-nucleotídeos foi mais trabalhosa devido ao grande ruído nos sequenciamentos, possivelmente levando à erros de genotipagem, como foi identificado para o locus GD09, que foi excluído das análises. Em relação aos microssatélites com repetições de tri-nucleotídeos, quando amplificados com sucesso para os indivíduos, a identificação dos alelos foi mais fácil, contando com menor nível de ruído, mas foi também identificado um locus monomórfico (GD21), ilustrando o menor polimorfismo em microssatélites desta classe. Para futuras análises na espécie *G. amarali*, uma possibilidade é a utilização de microssatélites com repetições de tetra-nucleotídeos, apontados como altamente polimórficos e com alelos facilmente identificáveis (Gardner *et al.*, 2011).

## **2. Desequilíbrio de ligação**

Entre os 8 microssatélites que foram amplificados com sucesso para todos os indivíduos, os loci GD04, GD08 e GD09 exibiram evidências significativas de desequilíbrio de ligação. Quando ocorre a ligação física entre os loci, há uma redução no grau de variabilidade genética e, portanto, usá-los em análises de maternidade e paternidade diminui a probabilidade de exclusão de alguns indivíduos, prejudicando a atribuição correta de pais entre os filhotes (Chakraborty & Hedrick, 1983). Além disso, os programas de análise de maternidade e paternidade que empregam técnicas de atribuição categórica, como o programa CERVUS 3.0.7 (Kalinowski *et al.*, 2007), assumem que os loci analisados estão em equilíbrio de ligação. Como poucos loci são utilizados em análises com microssatélites, há uma baixa probabilidade de que eles estejam ligados entre si, portanto os pesquisadores normalmente assumem que há equilíbrio de ligação na utilização dos diferentes programas. No entanto, diversos estudos têm mostrado a ocorrência de desequilíbrio de ligação em diferentes espécies (Ardren *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 1998; Nagarajan *et al.*, 2009; Sherrington *et al.*, 1991), indicando a importância de testes de ocorrência de desequilíbrio entre os microssatélites estudados antes de partir para análises de maternidade e paternidade. Como sugerido por Jones e Ardren (2003), como os programas atualmente disponíveis

não acomodam casos de desequilíbrio de ligação entre os marcadores utilizados, o mais indicado é excluir loci com evidências de desequilíbrio das análises.

### 3. Alelos nulos

Outra questão extensivamente abordada em análises utilizando microssatélites é a presença e o impacto do emprego de loci contendo alelos nulos. Alelos nulos são alelos que não são amplificados em PCR e podem ser causados por (1) falha na hibridação graças a divergências entre os primers desenhados e o DNA estudado, (2) amplificação diferencial entre alelos de diferentes tamanhos, pois alelos menores normalmente são amplificados de forma mais eficiente do que alelos maiores, fazendo com que em heterozigotos somente o menor alelo seja amplificado e, por fim, (3) pela baixa qualidade ou quantidade de DNA disponível dos espécimes estudados (Dakin & Avise, 2004). Na prática, a presença de alelos nulos gera discrepâncias na frequência alélica da população, pois o alelo de indivíduos homozigotos pode não ser amplificado e heterozigotos passam a ser identificados erroneamente como homozigotos. Em análises de maternidade e paternidade, graças a tais erros de genotipagem produzidos, a recomendação geral é a não utilização de loci com suspeita de alelos nulos, pois gera-se um aumento na probabilidade de exclusão de verdadeiros pais (Carlsson, 2008).

O principal método utilizado na identificação de possíveis alelos nulos, também empregado pelo programa CERVUS 3.0.7 (Kalinowski *et al.*, 2007), utilizado neste trabalho, é a identificação de excesso de homozigotos na população através de desvios no Equilíbrio de Hardy-Weinberg. No entanto, outros fatores biológicos podem causar os desvios observados, como consanguinidade, seleção e estruturação populacional (Dakin & Avise, 2004). Uma solução empregada para determinar com mais confiança a presença de alelos nulos é o estudo genético de grupos familiares para os quais há evidência observacional de maternidade e paternidade (McCoy, Jones & Avise, 2001). Infelizmente, não há evidências desse tipo para a população de *G. amarali* estudada, de forma que a certeza sobre a ocorrência de alelos nulos entre os loci analisados não é garantida. Diante desta incerteza e da recomendação dos próprios autores do programa CERVUS, de exclusão de loci com alta frequência de alelos nulos ( $>0,05$ ), optou-se pela exclusão do locus GD07 das análises.

Em futuros estudos seria interessante desenhar novos pares de primers para este locus de microssatélite, de forma tentar alcançar as frequências alélicas esperadas em

caso de Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Caso isso seja possível, também seria importante sequenciar esse trecho para identificar o que causou o alelo nulo em primeiro lugar. De acordo com revisão feita por Dakin e Avise (2004), somente cerca de 3% dos trabalhos publicados que identificaram a ocorrência de alelos nulos chegou a investigar as bases moleculares para seu surgimento, como ocorrência de deleções ou substituições entre pares de base.

#### **4. Análises de maternidade e paternidade entre indivíduos de *Gymnodactylus amarali***

Apesar do sucesso em caracterizar três loci de microssatélites polimórficos e da baixa probabilidade média de não exclusão de um casal de pais não relacionados ao filhote (6,73%), não foi possível atribuir com os níveis pré-determinados de confiança (80% e 95%) a paternidade e maternidade dos juvenis de *G. amarali*. Nenhum dos pares de pais formados durante a análise superou o valor crítico de LOD (9,99) estimado durante a simulação de análise de maternidade e paternidade.

A incerteza na determinação dos pais é evidente quando se observa a lista de casais que obtiveram um valor de LOD positivo e que, portanto, não foram excluídos como possíveis pais. Para alguns filhotes, como MTR 14609, MTR 14640 e MTR 14649 existem, respectivamente, 57, 44 e 36 casais para os quais pode ser atribuída a paternidade/maternidade. Enquanto isso, para o indivíduo MTR 14605, por exemplo, somente um casal não foi excluído como possibilidade. Dessa forma, pode-se concluir que um número maior de loci de microssatélites polimórficos é necessário para a identificação com maior confiança dos pais dos filhotes.

Entre os possíveis pais, foram observados casos em que os casais de adultos e o filhote em questão viviam no mesmo cupinzeiro, como para os filhotes MTR 14609 (cupinzeiro 2), MTR 14643 (cupinzeiro 6), MTR 14649 (cupinzeiro 8) e MTR 14656 (cupinzeiro 9). Porém, para a maior parte dos filhotes, os adultos que viviam no mesmo cupinzeiro não apareceram na lista de possíveis pais, sugerindo a possibilidade de existirem outros motivos além da seleção de parentesco para a formação de grupos na espécie.

Em estudo publicado por Kearney e colaboradores (2001), explicações de origem abiótica, como utilização de refúgios contra alterações de temperatura, e explicações bióticas, como abundância de alimentos, proteção contra predadores e

atração entre indivíduos da mesma espécie, foram levantadas como possíveis motivos para o agrupamento de indivíduos verificado na infra-ordem Gekkota.

Apesar da hipótese inicial de que os indivíduos encontrados no mesmo cupinzeiro durante a coleta sejam realmente grupos de mães, pais e filhotes, existem outras alternativas para explicar alguns dos resultados obtidos. Uma delas é de que tanto jovens como adultos podem se mover entre cupinzeiros. Esta hipótese está de acordo com o estudo feito por Mesquita e colaboradores (2006), no qual indivíduos de *Gymnodactylus amarali* foram capturados em cercas-guia que eram monitoradas durante as primeiras horas da manhã, sugerindo uma movimentação dos animais do lado de fora de cupinzeiros, especialmente durante a noite.

Com a caracterização de um maior número de marcadores de microssatélites e um incremento no conhecimento atual sobre a ecologia comportamental da espécie, com observações ao longo de todo o ano e técnicas de marcação e recaptura, será possível no futuro testar a hipótese de formação de grupos estáveis em *G. amarali*, assim como verificar a composição genética desses grupos.

## Conclusões

---

O presente trabalho permitiu concluir que:

1. As técnicas de Sequenciamento de Nova Geração (NGS) podem ser empregadas com sucesso para a identificação de loci de microssatélites polimórficos para espécies não-modelo.
2. Apesar do grande número de loci obtidos através das técnicas de NGS, em muitos casos a amplificação não ocorre ou ocorre de forma inespecífica. Além disso, a suposição de que microssatélites estão em equilíbrio de ligação não foi verificada para parte dos loci estudados, de forma que a ocorrência de desequilíbrio deve ser sempre testada.
3. Na atribuição categórica, foram observados casos em que os candidatos à paternidade e maternidade, assim como o filhote, viviam no mesmo cupinzeiro. Porém, para a maior parte dos casos, os adultos que viviam no mesmo cupinzeiro não apareceram na lista de possíveis pais, sugerindo a possibilidade de existirem outros motivos além da seleção de parentesco para a formação de grupos na espécie.
4. Para que a atribuição categórica de mães e pais dos filhotes seja realizada com maior nível de confiança (95% ou 80%), há a necessidade de um maior número de microssatélites polimórficos para a espécie estudada.

## Resumo

---

Sistemas sociais podem variar desde simples agregados efêmeros de poucos indivíduos até sociedades complexas e a seleção de parentesco é uma das principais teorias utilizadas para explica-los.

Em estudo recente, feito com populações de *Gymnodactylus amarali* coletadas na Estação Ecológica Serra Geral do Tocantins (EESGT), descobriu-se a formação de pequenos grupos no interior de cupinzeiros, normalmente compostos por machos e fêmeas sexualmente maduros e indivíduos jovens. Dessa forma, os objetivos deste trabalho foram atribuir aos filhotes os mais prováveis pais dentro da população e analisar a relação de maternidade e paternidade entre indivíduos encontrados no interior de cada um dos cupinzeiros e entre indivíduos provenientes de cupinzeiros distintos. Para isso, foram empregadas técnicas de Sequenciamento de Nova Geração na construção de biblioteca de microssatélites para a espécie.

O genoma de um indivíduo foi parcialmente sequenciado utilizando a plataforma MiSeq v2 (Illumina) e, ao final das análises, foi obtido um total de 42.521 loci de microssatélites perfeitos para os quais puderam ser desenhados primers. Destes, foram sintetizados 23 pares de primers, sendo 14 de repetições de di-nucleotídeos e 9 de repetições de tri-nucleotídeos. Entre estes, quinze não puderam ser analisados devido à amplificação inespecífica ou inexistente, um foi monomórfico e quatro foram excluídos devido à presença de desequilíbrio de ligação, indícios de erros de genotipagem ou alta frequência de alelos nulos.

Três microssatélites se mostraram polimórficos e foram utilizados na genotipagem dos 43 indivíduos amostrados. Apesar da baixa probabilidade média de não excluir um casal de pais não relacionados ao filhote (6,73%), não foi possível atribuir com os níveis pré-determinados de confiança (80% e 95%) a paternidade e maternidade dos jovens. Após a análise, entre os casais que apareceram na lista de possíveis pais, foram observados casos em que os três indivíduos viviam no mesmo cupinzeiro. No entanto, para a maior parte dos agrupamentos, os adultos que viviam no mesmo cupinzeiro que os filhotes não apareceram como possíveis pais, indicando a possibilidade de outras explicações para a formação de grupos na espécie.

## *Abstract*

---

Social systems might range from simple, transient groups composed by few individuals to complex societies, and kin selection is one of the main theories used to explain them.

In recent study on *Gymnodactylus amarali*'s populations, sampled at Estação Ecológica Serra Geral do Tocantins (EESGT), small groups of individuals, composed by sexually mature males and females as well as juveniles, were found inside termite's nests. With that said, the main goals of this work is assign the offspring to to the most likely parents within the population and analyze the maternity and paternity relationships between individuals found in the same termite's nest, as well as between individuals from different nests. To achieve these goals, next-generation sequencing technology was used to develop a microsatellite-enriched library for the species.

The partial genome of one individual was sequenced using the Illumina MiSeq platform, resulting in a total of 42.521 perfect microsatellite loci for which primers could be design. Among these, 23 primer pairs were design for microsatellite sequences amplifications, being 14 for di-nucleotides and 9 for tri-nucleotides. Fifteen of those could not be used due to problems during the amplification process, one showed no signs of polymorphism and four were excluded from the analysis due to linkage disequilibrium, genotyping errors or high frequency of null alleles.

Three microsatellite loci showed polymorphism and were successfully scored in all 43 individuals. Even though they showed a low average probability that this set of loci will not exclude a pair of unrelated candidate parents from parentage of an arbitrary offspring (6,73%), the parentage assignment could not be achieved under the pre-determined levels of confidence (80% e 95%). After the analysis, among the couples that appeared in the list as possible parents, there were cases where the trio (male, female and offspring) lived in the same termite's nest. However, for most groups, the adults that lived in the same nest as the offspring did not appear in the list as possible parents, suggesting other reasons besides kin selection as an explanation for the group formation in the species.

## Referências Bibliográficas

---

Amarello, M. & Smith, J.J. 2012. *Social snakes? The role of kin selection in rattlesnake aggregations*. *Sonoran Herpetologist*, 25(12), 129-130.

Andrews, S. 2010. *FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data*. Disponível online em: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

Ardren, W.R., Borer, S., Thrower, F., Joyce, J.E., & Kapuscinski, A.R. 1999. *Inheritance of 12 microsatellite loci in *Oncorhynchus mykiss**. *Journal of Heredity*, 90(5), 529-536.

Ashley, M.V., Berger-Wolf, T.Y., Caballero, I.C., Chaovalitwongse, W., DasGupta, B. & Sheikh, S.I. 2009. *Full sibling reconstruction in wild populations from microsatellite genetic markers*. *Computational Biology: New Research* (ed. Russe AS), 231–258.

Barbour, T. 1925. *New Neotropical lizards*. *Proc Biol Soc Washington* 38, 101–102.

Barry, M. 2010. *Shelter aggregations, social behavior, and seasonal plasma corticosterone levels in captive and wild *Duvaucel's geckos, Hoplodactylus duvaucelii**. PhD Thesis: Massey University, Albany.

Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M. & Davis, R.W. 1980. *Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms*. *American Journal of Human Genetics* 32, 314-331.

Carlsson, J. 2008. *Effects of microsatellite null alleles on assignment testing*. *Journal of Heredity*, 99(6), 616-623.

Cavalcanti, R. & Joly, C.A. 2002. *Biodiversity and conservation priorities in the Cerrado region*. In *The Cerrados of Brazil: Ecology and Natural History of a*

Neotropical Savanna. (P.S. Oliveira & R.J. Marquis, eds.). Columbia University Press, New York, 351-367.

Chakraborty, R. & Hedrick, P.W. 1983. *Paternity exclusion and the paternity index for two linked loci*. Human Heredity, 33(1),13-23.

Chakraborty, R., Shaw, M., & Schull, W. J. 1974. *Exclusion of paternity: the current state of the art*. American Journal of Human Genetics, 26(4), 477.

Chapple, D.G. & Keogh, J.S. 2006. *Group structure and stability in social aggregations of White's skink, Egernia whitii*. Ethology 112, 247–257.

Chapple, D.G. 2003. *Ecology, life-history, and behavior in the Australian scincid genus Egernia, with comments on the evolution of complex sociality in lizards*. Herpetological Monographs 17, 145–180.

Clark, R.W., Brown, W.S., Stechert, R. & Greene, H.W. 2012. *Cryptic sociality in rattlesnakes (Crotalus horridus) detected by kinship analysis*. Biology Letters 8(4), 523-525.

Colli, G.R., Mesquita, D.O., Paulo V. V. Rodrigues & Kitayama, K. 2003. *Ecology of the Gecko Gymnodactylus geckoides amarali in a Neotropical Savanna*. Journal of Herpetology 37(4), 694-706.

Cooper, W.E., Caffrey, C. & Vitt, L.J. 1985. *Aggregation in the Banded Gecko, Coleonyx variegatus*. Herpetologica 41(3), 342-350.

Dakin, E.E. & Avise, J.C. 2004. *Microsatellite null alleles in parentage analysis*. Heredity, 93(5), 504-509.

Davies, N.B., Krebs, J.R. & West, S.A. 1981. *An Introduction to Behavioural Ecology*. 4a Edição. Oxford: Wiley-Blackwell, 2012. 506 pgs.

Davis, A.R. 2011. *Kin presence drives philopatry and social aggregation in juvenile Desert Night Lizards (Xantusia vigilis)*. Behavioral Ecology 23, 18–24.

Davis, A.R., Corl, A., Surget-Groba, Y. & Sinervo, B. 2010. *Convergent evolution of kin-based sociality in a lizard*. Proceedings of the Royal Society of London B 278, 1507–1514.

De Oliveira, B.H.S., de Queiroz, R.N.M. & Mesquita, D.O. 2014. *Communal nests and hatchling size of Coleodactylus meridionalis (Squamata: Sphaerodactylidae) in a Caating area, northeastern Brazil*. Herpetology Notes 8, 125-128.

Devlin, B., Roeder, K. & Ellstrand, N.C. 1988. *Fractional paternity assignment: theoretical development and comparison to other methods*. Theoretical and Applied Genetics, 76(3), 369–380.

Domingos, F.M.C.B., Bosque, R.J., Cassimiro, J., Colli, G.R., Rodrigues, M.T., Santos, M.G. & Beheregaray, L.B. 2014. *Out of the deep: cryptic speciation in a Neotropical gecko (Squamata, Phyllodactylidae) revealed by species delimitation methods*. Molecular phylogenetics and evolution, 80, 113-124.

Eberhard, M.J.W. 1975. *The Evolution of Social Behavior by Kin Selection*. The Quarterly Review of Biology 50(1), 1-33.

Ewing, B. & Green, P. 1998. *Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities*. Genome research 8, 186-194.

Gardner, M.G., Fitch, A.J., Bertozzi, T. & Lowe, A.J. 2011. *Rise of the machines – recommendations for ecologists when using next generation sequencing for microsatellite development*. Molecular Ecology Resources, 11: 1093-1101.

Gardner, M.G., Pearson, S.K., Johnston, G.R. & Schwarz, M.P. 2016. *Group living in squamate reptiles: a review of evidence for stable aggregations*. Biological Reviews 91, 925-936.

Hadfield, J.D., Richardson, D.S. & Burke, T. 2006. *Towards unbiased parentage assignment: combining genetic, behavioural and spatial data in a Bayesian framework*. *Molecular Ecology*, 15: 3715-3730.

Hamilton, W.D. 1964. *The genetical evolution of social behavior*. *Journal of Theoretical Biology* 7, 1–52.

Hearne, C.M, Ghosh, S. & Todd, J.A. 1992. *Microsatellites for linkage analysis of genetic traits*. *Trends in Ecology and Evolution* 8: 288-294.

ICMBIO – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. 2014. *Plano de manejo – Estação Ecológica Serra Geral do Tocantins*.

Jamieson, A. & Taylor, St.C.S. 1997. *Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion*. *Animal Genetics* 28: 397-400.

Jones, A.G. & Ardren, W.R. 2003. *Methods of parentage analysis in natural populations*. *Molecular ecology*, 12, 2511-2523.

Jones, A.G., Kvarnemo, C., Moore, G.I., Simmons, L.W. and Avise, J.C. 1998. *Microsatellite evidence for monogamy and sex-biased recombination in the Western Australian seahorse *Hippocampus angustus**. *Molecular Ecology*, 7, 1497-1505.

Jones, A.G., Small, C.M., Paczolt, K.A. & Ratterman, N.L. 2010. *A practical guide to methods of parentage analysis*. *Molecular Ecology Resources*, 10, 6-30.

Kalinowski, S.T., Taper, M.L. & Marshall, T.C. 2007. *Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment*. *Molecular Ecology*, 16, 1099-1106.

Kan, T.H., Han, S.H. & Park, S.J. 2015. *Development of Seven Microsatellite Markers Using Next Generation Sequencing for the Conservation on the Korean Population of*

*Dorcus hopei* (E. Saunders, 1854) (Coleoptera, Lucanidae). International Journal of Molecular Sciences 16, 21330-21341.

Kearney, M., Shine, R., Comber, S. & Pearson, D. 2001. *Why Do Geckos Group? An Analysis of "Social" Aggregations in Two Species of Australian Lizards*. Herpetologica 54(4), 411-422.

Lance, S.L., Love, C.N., Nunziata, S.O., O'Bryhim, J.R., Scott, D.E., Flynn, R.W., & Jones, K.L. 2013. *32 species validation of a new Illumina paired-end approach for the development of microsatellites*. PloS one, 8(11), e81853.

Li, D., Liu, C.M., Luo, R., Sadakane, K. & Lam, T.-W. 2015. *MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph*. Bioinformatics, 31, 1674-1676.

Lima, D.C., Passos, D.C. & Borges-Nojosa, D.M. 2011. *Communal nests of Phyllopezus periosus, an endemic gecko of the Caatinga of northeastern Brazil*. Salamandra 47(4), 227-228.

Magalhães, R.G. 2016. *Análise da diversidade morfológica e genética de populações da espécie Gymnodactylus amarali, 1925 (Squamata: Gekkota: Phyllodactylidae)*. 44 pgs. Trabalho de Pesquisa em Biologia (Graduação em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Marshall, T.C., Slate, J.B.K.E., Kruuk, L.E.B., & Pemberton, J.M. 1998. *Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations*. Molecular ecology, 7(5), 639-655.

Masters, C. & Shine, R. 2003. *Sociality in lizards: family structure in free-living King's Skinks Egernia kingii from southwestern Australia*. Australian Zoologist 32, 377-380.

Mccooy, E.E., Jones, A.G. & Avise, J.C. 2001. *The genetic mating system and tests for cuckoldry in a pipefish species in which males fertilize eggs and brood offspring externally*. *Molecular Ecology*, 10: 1793-1800.

Meagher, T.R., & Thompson, E. 1986. *The relationship between single parent and parent pair genetic likelihoods in genealogy reconstruction*. *Theoretical Population Biology*, 29(1), 87-106.

Mesquita, D.O., Colli, G.R., França, F.G.R. & Vitt, L. 2006. *Ecology of a Cerrado Lizard Assemblage in the Jalapão Region of Brazil*. *Copeia*, 2006(3), 406-471.

Meyer, A. & Mouton, P. 2007. *Aggregation in Bibron's gecko, Chondrodactylus bibronii*. *African Journal of Herpetology* 56, 137–147

Nagarajan, M., Kumar, N., Nishanth, G., Haribaskar, R., Paranthaman, K., Gupta, J., Mishra, M., Vaidhegi, R., Kumar, S., Ranjan, A.K. & Kumar, S. 2009. *Microsatellite markers of water buffalo, Bubalus bubalis - development, characterisation and linkage disequilibrium studies*. *BMC Genetics*, 10, 68.

Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press: New York.

O'Connor, D. & Shine, R. 2003. *Lizards in 'nuclear families': a novel reptilian social system in Egernia saxatilis (Scincidae)*. *Molecular Ecology* 12, 743–752.

Rabosky, A.R., Corl, A., Liwanag, H.E., Surget-Groba, Y. & Sinervo, B. 2012. *Direct fitness correlates and thermal consequences of facultative aggregation in a desert lizard*. *PLoS ONE* 7, e40866.

Raymond M. & Rousset F. 1995. *GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism*. *J. Heredity*, 86:248-249

Recoder, R.S., Teixeira Jr., M., Camacho, A., Nunes, P.M.S., Mott, T., Valdujo, P.H., Ghellere, J.M., Nogueira, C. & Rodrigues, M.T. 2011. *Reptiles of Serra Geral do Tocantins Ecological Station, Central Brazil*. Biota Neotropica, 11 (1).

Righi, A.F., Galdino, C.A.B. & Nascimento, L.B. 2004. *Phyllopezus pollicaris* (Rock Gecko). *Clutch Size and Oviposition Sites*. Herpetological Review 35(4), 395-396.

Rousset, F., 2008. *Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux*. Molecular Ecology Resources 8: 103-106.

Rozen, S. & Skaletsky, H. 2000. *Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers*. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 132, 365-386.

Sherrington, R., Melmer, G., Dixon, M., Curtis, D., Mankoo, B., Kalsi, G., & Gurling, H. 1991. *Linkage disequilibrium between two highly polymorphic microsatellites*. American journal of human genetics, 49(5), 966–971.

Summers, K. & Amos, W. 1997. *Behavioral, ecological and molecular genetic analyses of reproductive strategies in the Amazonian dart-poison frog, Dendrobates ventrimaculatus*. Behavioral Ecology 8: 260-267

Tautz, D. 1989. *Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers*. Nucleic Acids Research, 17(16), 6463–6471.

Thiel, T., Michalek, W., Varshney, R.K. & Graner, A. 2003. *Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (Hordeum vulgare L.)*. Theoretical and Applied Genetics, 106(3), 411-22.

Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P., & Shipley, P. 2004. *MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data*. Molecular Ecology Notes, 4(3), 535-538.

Vanzolini, P.E. 1953. *Sobre a diferenciação geográfica de *Gymnodactylus geckoides* (Sauria, Gekkonidae)*. Papéis Avulsos do Departamento de Zoologia, vol. 11, pp. 225–262.

Vanzolini, P.E. 1982. *A new *Gymnodactylus* from Minas Gerais, Brasil, with remarks on the genus, on the area and on montane endemisms in Brasil (Sauria, Gekkonidae)*. Papéis Avulsos de Zoologia, São Paulo, vol. 34, pp. 408–413.

Waits, L.P., Luikart, G. & Taberlet, P. 2001. *Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines*. Molecular Ecology 10, 249-256.

Werner, D.I., Baker, E.M., Gonzalez, E. del C. & Sosa, I.R. 1987. *Kinship Recognition and Grouping in Hatchling Green Iguanas*. Behavioral Ecology and Sociobiology 21(2), 83-89.

Yu, J.N., Won, C., Jun, J., Lim, Y. & Kwak, M. 2011. *Fast and Cost-Effective Mining of Microsatellite Markers Using NGS Technology: An Example of a Korean Water Deer *Hydropotes inermis argyropus**. PLoS ONE 6(11): e26933.

## Anexos

Anexo 1. Primers específicos da espécie *Gymnodactylus amarali*, desenvolvidos a partir de sequenciamento de próxima geração. Identificação do microsatélite (Micro.), unidade de repetição, sequências dos primers e tamanho esperado do produto em pares de base.

| Micro. | Repetição | Primers (5'-3')  | Tamanho do produto (bp) |
|--------|-----------|--|-------------------------|
| GD01   | (CA)13    | F: 5'-ACAACCAGGGTGGCTCTG-3'<br>R: 5'-CTGGATGGTTGTGTTTGTGCC-3'    | 137                     |
| GD02   | (CT)12    | F: 5'-GATATACGGTGACGCGGTG-3'<br>R: 5'-ACAAGTTTGTCTGCTGGGC-3'     | 223                     |
| GD03   | (CA)14    | F: 5'-AAGGCTGCCTCTCCAACC-3'<br>R: 5'-TTACGAGGGCTGGATCTGAC-3'     | 130                     |
| GD04   | (GA)11    | F: 5'-CCAGGAACTACGCCACTGAG-3'<br>R: 5'-TTCTGCCAATTCATGAGCAC-3'   | 130                     |
| GD05   | (TG)14    | F: 5'-AGCCGAGTACAGAAGCAAGG-3'<br>R: 5'-TACTTCCAGGCAGGAGGTTG-3'   | 130                     |
| GD06   | (TG)14    | F: 5'-CATCCAGTTGACTGAGGCAG-3'<br>R: 5'-AGGCACACCCAGTAGGTCAC-3'   | 135                     |
| GD07   | (GT)12    | F: 5'-AGTGAGTTCGACACCCTGC-3'<br>R: 5'-TGCAGCATGCTACCTGTTGT-3'    | 132                     |
| GD08   | (GT)13    | F: 5'-GGAGCAAAGTTGCAAACCTC-3'<br>R: 5'-GTTGCCAGCTGAGGATAAGC-3'   | 132                     |
| GD09   | (TC)10    | F: 5'-GCAGGGAGATTCAGGTTTGA-3'<br>R: 5'-GTGGATTGAACGCTGTTTGA-3'   | 136                     |
| GD10   | (TC)10    | F: 5'-GCCGTCCAGCTGTCACTAC-3'<br>R: 5'-GCTCATGCCGACTATGAACA-3'    | 156                     |
| GD11   | (CA)12    | F: 5'-CATGGCTACCCAGCTGAATC-3'<br>R: 5'-CCAACAATGCATGACTGGAG-3'   | 237                     |
| GD12   | (AG)18    | F: 5'-TGGGCACCAATGTAAACTG-3'<br>R: 5'-TACGGTTGCTAGTACCGGCT-3'    | 220                     |
| GD13   | (TC)17    | F: 5'-GAAATGCGTTCAGTTCAGC-3'<br>R: 5'-ACCAGAATGGCTTCAGACGA-3'    | 221                     |
| GD14   | (AC)14    | F: 5'-ATCTGCATAGGATTGCCCTG-3'<br>R: 5'-GCCTACTGTTAGGGTTGCCA-3'   | 251                     |
| GD15   | (CTC)10   | F: 5'-ATGCTCATCCAGATCCAAGC-3'<br>R: 5'-AGGATACATGCGGTTCCAAG-3'   | 139                     |
| GD16   | (CTC)10   | F: 5'-GGATTGTAAGCCGCTTTGAG-3'<br>R: 5'-ACCTGGTGACTTCCAGATCG-3'   | 139                     |
| GD17   | (GAA)12   | F: 5'-CCAATACGGCTACCCTCTGA-3'<br>R: 5'-CTGGACCGTTCTCAGGTATG-3'   | 148                     |
| GD18   | (AAT)10   | F: 5'-CCCAACTGAAGGAATAGGCA-3'<br>R: 5'-TGAAGCCTTACAGCTTAACACC-3' | 229                     |
| GD19   | (ACC)12   | F: 5'-CAACGGCATCCAGATACAAG-3'<br>R: 5'-TACGTTTGCAGGATTGGTCC-3'   | 130                     |
| GD20   | (ACT)14   | F: 5'-GAGCAGGCTTACAATCTGG-3'<br>R: 5'-GCACGGTCATCCAGTCTACA-3'    | 228                     |
| GD21   | (AGC)10   | F: 5'-CACATCCGCACCATTTACTG-3'<br>R: 5'-CAGTCAGAAATCTGCAGCCA-3'   | 231                     |
| GD22   | (AGT)12   | F: 5'-GAAGGCCAAGACACTTCCAG-3'<br>R: 5'-CAGCCATTCATGAGCTTGC-3'    | 226                     |
| GD23   | (ATC)14   | F: 5'-TGCAGAAAGTCCCAGGTTCT-3'<br>R: 5'-ACCTACTGGCTGGTCTTCA-3'    | 224                     |

Anexo 2. Lista de filhotes e possíveis pares de pais com valores de LOD positivo. Identificação dos filhotes (Filhotes Id), identificação das fêmeas candidatas à maternidade (Fêmeas Id), identificação dos machos candidatos à paternidade (Machos Id), número dos cupinzeiros onde cada indivíduo foi identificado (N. do cupinzeiro) e valor de LOD para o trio composto por filhote, mãe e pai (LOD).

| <b>Filhotes Id.</b> | <b>N. do cupinzeiro</b> | <b>Fêmeas Id.</b> | <b>N. do cupinzeiro</b> | <b>Machos Id.</b> | <b>N. do cupinzeiro</b> | <b>LOD</b> |
|---------------------|-------------------------|-------------------|-------------------------|-------------------|-------------------------|------------|
| <b>MTR 14610</b>    | 1                       | MTR 14807         | 15                      | MTR 14711         | 14                      | 3,20E+14   |
| <b>MTR 14610</b>    | 1                       | MTR 14651         | 8                       | MTR 14711         | 14                      | 4,87E+13   |
| <b>MTR 14610</b>    | 1                       | MTR 14708         | 14                      | MTR 14711         | 14                      | 4,87E+13   |
| <b>MTR 14610</b>    | 1                       | MTR 14658         | 9                       | MTR 14711         | 14                      | 4,87E+13   |
| <b>MTR 14610</b>    | 1                       | MTR 14710         | 14                      | MTR 14711         | 14                      | 4,87E+13   |
| <b>MTR 14611</b>    | 1                       | MTR 14708         | 14                      | MTR 14606         | 1                       | 1,83E+14   |
| <b>MTR 14611</b>    | 1                       | MTR 14708         | 14                      | MTR 14691         | 10                      | 1,49E+14   |
| <b>MTR 14611</b>    | 1                       | MTR 14701         | 12                      | MTR 14606         | 1                       | 1,13E+14   |
| <b>MTR 14611</b>    | 1                       | MTR 14646         | 7                       | MTR 14691         | 10                      | 1,05E+14   |
| <b>MTR 14611</b>    | 1                       | MTR 14655         | 9                       | MTR 14693         | 9                       | 2,29E+13   |
| <b>MTR 14611</b>    | 1                       | MTR 14703         | 13                      | MTR 14693         | 9                       | 2,27E+13   |
| <b>MTR 14611</b>    | 1                       | MTR 14613         | 2                       | MTR 14693         | 9                       | 2,27E+13   |
| <b>MTR 14611</b>    | 1                       | MTR 14604         | 2                       | MTR 14693         | 9                       | 2,27E+13   |
| <b>MTR 14611</b>    | 1                       | MTR 14807         | 15                      | MTR 14705         | 13                      | 3,86E+12   |
| <b>MTR 14609</b>    | 2                       | MTR 14703         | 13                      | MTR 14608         | 2                       | 3,75E+14   |
| <b>MTR 14609</b>    | 2                       | MTR 14604         | 2                       | MTR 14608         | 2                       | 3,75E+14   |
| <b>MTR 14609</b>    | 2                       | MTR 14613         | 2                       | MTR 14608         | 2                       | 3,75E+14   |
| <b>MTR 14609</b>    | 2                       | MTR 14604         | 2                       | MTR 14806         | 15                      | 3,08E+14   |
| <b>MTR 14609</b>    | 2                       | MTR 14613         | 2                       | MTR 14806         | 15                      | 3,08E+14   |
| <b>MTR 14609</b>    | 2                       | MTR 14703         | 13                      | MTR 14806         | 15                      | 3,08E+14   |
| <b>MTR 14609</b>    | 2                       | MTR 14655         | 9                       | MTR 14806         | 15                      | 3,07E+14   |
| <b>MTR 14609</b>    | 2                       | MTR 14646         | 7                       | MTR 14641         | 6                       | 3,07E+14   |
| <b>MTR 14609</b>    | 2                       | MTR 14613         | 2                       | MTR 14650         | 8                       | 3,06E+14   |
| <b>MTR 14609</b>    | 2                       | MTR 14604         | 2                       | MTR 14650         | 8                       | 3,06E+14   |
| <b>MTR 14609</b>    | 2                       | MTR 14703         | 13                      | MTR 14650         | 8                       | 3,06E+14   |
| <b>MTR 14609</b>    | 2                       | MTR 14658         | 9                       | MTR 14608         | 2                       | 3,06E+14   |
| <b>MTR 14609</b>    | 2                       | MTR 14710         | 14                      | MTR 14608         | 2                       | 3,06E+14   |
| <b>MTR 14609</b>    | 2                       | MTR 14703         | 13                      | MTR 14705         | 13                      | 2,38E+14   |
| <b>MTR 14609</b>    | 2                       | MTR 14613         | 2                       | MTR 14705         | 13                      | 2,38E+14   |
| <b>MTR 14609</b>    | 2                       | MTR 14604         | 2                       | MTR 14705         | 13                      | 2,38E+14   |
| <b>MTR 14609</b>    | 2                       | MTR 14613         | 2                       | MTR 14704         | 13                      | 2,38E+14   |
| <b>MTR 14609</b>    | 2                       | MTR 14604         | 2                       | MTR 14704         | 13                      | 2,38E+14   |
| <b>MTR 14609</b>    | 2                       | MTR 14703         | 13                      | MTR 14704         | 13                      | 2,38E+14   |
| <b>MTR 14609</b>    | 2                       | MTR 14642         | 6                       | MTR 14608         | 2                       | 2,38E+14   |
| <b>MTR 14609</b>    | 2                       | MTR 14710         | 14                      | MTR 14650         | 8                       | 2,38E+14   |
| <b>MTR 14609</b>    | 2                       | MTR 14658         | 9                       | MTR 14650         | 8                       | 2,38E+14   |
| <b>MTR 14609</b>    | 2                       | MTR 14655         | 9                       | MTR 14705         | 13                      | 1,70E+14   |
| <b>MTR 14609</b>    | 2                       | MTR 14642         | 6                       | MTR 14650         | 8                       | 1,70E+14   |
| <b>MTR 14609</b>    | 2                       | MTR 14658         | 9                       | MTR 14704         | 13                      | 1,69E+14   |
| <b>MTR 14609</b>    | 2                       | MTR 14710         | 14                      | MTR 14704         | 13                      | 1,69E+14   |
| <b>MTR 14609</b>    | 2                       | MTR 14710         | 14                      | MTR 14705         | 13                      | 1,02E+14   |

Cont. Anexo 2. Lista de filhotes e possíveis pares de pais com valores de LOD positivo. Identificação dos filhotes (Filhotes Id), identificação das fêmeas candidatas à maternidade (Fêmeas Id), identificação dos machos candidatos à paternidade (Machos Id), número dos cupinzeiros onde cada indivíduo foi identificado (N. do cupinzeiro) e valor de LOD para o trio composto por filhote, mãe e pai (LOD).

| <b>Filhotes Id.</b> | <b>N. do cupinzeiro</b> | <b>Fêmeas Id.</b> | <b>N. do cupinzeiro</b> | <b>Machos Id.</b> | <b>N. do cupinzeiro</b> | <b>LOD</b> |
|---------------------|-------------------------|-------------------|-------------------------|-------------------|-------------------------|------------|
| MTR 14609           | 2                       | MTR 14658         | 9                       | MTR 14705         | 13                      | 1,02E+14   |
| MTR 14609           | 2                       | MTR 14642         | 6                       | MTR 14704         | 13                      | 1,01E+14   |
| MTR 14609           | 2                       | MTR 14642         | 6                       | MTR 14705         | 13                      | 3,43E+13   |
| MTR 14609           | 2                       | MTR 14694         | 9                       | MTR 14641         | 6                       | 2,09E+13   |
| MTR 14605           | 4                       | MTR 14646         | 7                       | MTR 14711         | 14                      | 1,12E+14   |
| MTR 14605           | 4                       | MTR 14646         | 7                       | MTR 14699         | 12                      | 1,03E+14   |
| MTR 14607           | 4                       | MTR 14651         | 8                       | MTR 14606         | 1                       | 3,15E+13   |
| MTR 14607           | 4                       | MTR 14651         | 8                       | MTR 14704         | 13                      | 3,13E+12   |
| MTR 14637           | 5                       | MTR 14638         | 5                       | MTR 14691         | 10                      | 2,01E+14   |
| MTR 14639           | 5                       | MTR 14646         | 7                       | MTR 14711         | 14                      | 3,62E+14   |
| MTR 14639           | 5                       | MTR 14651         | 8                       | MTR 14711         | 14                      | 3,62E+14   |
| MTR 14639           | 5                       | MTR 14651         | 8                       | MTR 14699         | 12                      | 3,61E+14   |
| MTR 14639           | 5                       | MTR 14651         | 8                       | MTR 14608         | 2                       | 9,17E+12   |
| MTR 14640           | 5                       | MTR 14703         | 13                      | MTR 14704         | 13                      | 2,36E+14   |
| MTR 14640           | 5                       | MTR 14613         | 2                       | MTR 14704         | 13                      | 2,36E+14   |
| MTR 14640           | 5                       | MTR 14604         | 2                       | MTR 14704         | 13                      | 2,36E+14   |
| MTR 14640           | 5                       | MTR 14642         | 6                       | MTR 14608         | 2                       | 2,36E+14   |
| MTR 14640           | 5                       | MTR 14642         | 6                       | MTR 14606         | 1                       | 1,68E+14   |
| MTR 14640           | 5                       | MTR 14642         | 6                       | MTR 14704         | 13                      | 1,68E+14   |
| MTR 14640           | 5                       | MTR 14642         | 6                       | MTR 14650         | 8                       | 1,67E+14   |
| MTR 14640           | 5                       | MTR 14658         | 9                       | MTR 14704         | 13                      | 1,67E+14   |
| MTR 14640           | 5                       | MTR 14710         | 14                      | MTR 14704         | 13                      | 1,67E+14   |
| MTR 14640           | 5                       | MTR 14651         | 8                       | MTR 14705         | 13                      | 9,95E+13   |
| MTR 14640           | 5                       | MTR 14642         | 6                       | MTR 14705         | 13                      | 3,20E+13   |
| MTR 14643           | 6                       | MTR 14642         | 6                       | MTR 14641         | 6                       | 3,14E+14   |
| MTR 14643           | 6                       | MTR 14613         | 2                       | MTR 14704         | 13                      | 2,44E+14   |
| MTR 14643           | 6                       | MTR 14703         | 13                      | MTR 14704         | 13                      | 2,44E+14   |
| MTR 14643           | 6                       | MTR 14604         | 2                       | MTR 14704         | 13                      | 2,44E+14   |
| MTR 14643           | 6                       | MTR 14658         | 9                       | MTR 14704         | 13                      | 1,76E+14   |
| MTR 14643           | 6                       | MTR 14710         | 14                      | MTR 14704         | 13                      | 1,76E+14   |
| MTR 14643           | 6                       | MTR 14642         | 6                       | MTR 14704         | 13                      | 1,09E+14   |
| MTR 14643           | 6                       | MTR 14807         | 15                      | MTR 14641         | 6                       | 7,99E+13   |
| MTR 14643           | 6                       | MTR 14642         | 6                       | MTR 14705         | 13                      | 4,07E+13   |
| MTR 14645           | 7                       | MTR 14703         | 13                      | MTR 14641         | 6                       | 4,47E+14   |
| MTR 14645           | 7                       | MTR 14604         | 2                       | MTR 14641         | 6                       | 4,47E+14   |
| MTR 14645           | 7                       | MTR 14613         | 2                       | MTR 14641         | 6                       | 4,47E+14   |
| MTR 14645           | 7                       | MTR 14710         | 14                      | MTR 14641         | 6                       | 3,78E+14   |
| MTR 14645           | 7                       | MTR 14658         | 9                       | MTR 14641         | 6                       | 3,78E+14   |
| MTR 14645           | 7                       | MTR 14642         | 6                       | MTR 14641         | 6                       | 3,10E+14   |
| MTR 14645           | 7                       | MTR 14613         | 2                       | MTR 14705         | 13                      | 1,73E+14   |
| MTR 14645           | 7                       | MTR 14604         | 2                       | MTR 14705         | 13                      | 1,73E+14   |

Cont. Anexo 2. Lista de filhotes e possíveis pares de pais com valores de LOD positivo. Identificação dos filhotes (Filhotes Id), identificação das fêmeas candidatas à maternidade (Fêmeas Id), identificação dos machos candidatos à paternidade (Machos Id), número dos cupinzeiros onde cada indivíduo foi identificado (N. do cupinzeiro) e valor de LOD para o trio composto por filhote, mãe e pai (LOD).

| <b>Filhotes Id.</b> | <b>N. do cupinzeiro</b> | <b>Fêmeas Id.</b> | <b>N. do cupinzeiro</b> | <b>Machos Id.</b> | <b>N. do cupinzeiro</b> | <b>LOD</b> |
|---------------------|-------------------------|-------------------|-------------------------|-------------------|-------------------------|------------|
| MTR 14645           | 7                       | MTR 14703         | 13                      | MTR 14705         | 13                      | 1,73E+14   |
| MTR 14645           | 7                       | MTR 14658         | 9                       | MTR 14705         | 13                      | 1,04E+14   |
| MTR 14645           | 7                       | MTR 14710         | 14                      | MTR 14705         | 13                      | 1,04E+14   |
| MTR 14645           | 7                       | MTR 14807         | 15                      | MTR 14641         | 6                       | 7,60E+13   |
| MTR 14645           | 7                       | MTR 14642         | 6                       | MTR 14705         | 13                      | 3,66E+13   |
| MTR 14649           | 8                       | MTR 14655         | 9                       | MTR 14608         | 2                       | 3,60E+14   |
| MTR 14649           | 8                       | MTR 14604         | 2                       | MTR 14608         | 2                       | 3,60E+14   |
| MTR 14649           | 8                       | MTR 14703         | 13                      | MTR 14608         | 2                       | 3,60E+14   |
| MTR 14649           | 8                       | MTR 14613         | 2                       | MTR 14608         | 2                       | 3,60E+14   |
| MTR 14649           | 8                       | MTR 14655         | 9                       | MTR 14606         | 1                       | 2,92E+14   |
| MTR 14649           | 8                       | MTR 14604         | 2                       | MTR 14606         | 1                       | 2,92E+14   |
| MTR 14649           | 8                       | MTR 14613         | 2                       | MTR 14606         | 1                       | 2,92E+14   |
| MTR 14649           | 8                       | MTR 14703         | 13                      | MTR 14606         | 1                       | 2,92E+14   |
| MTR 14649           | 8                       | MTR 14655         | 9                       | MTR 14650         | 8                       | 2,92E+14   |
| MTR 14649           | 8                       | MTR 14651         | 8                       | MTR 14608         | 2                       | 2,91E+14   |
| MTR 14649           | 8                       | MTR 14613         | 2                       | MTR 14650         | 8                       | 2,91E+14   |
| MTR 14649           | 8                       | MTR 14604         | 2                       | MTR 14650         | 8                       | 2,91E+14   |
| MTR 14649           | 8                       | MTR 14703         | 13                      | MTR 14650         | 8                       | 2,91E+14   |
| MTR 14649           | 8                       | MTR 14651         | 8                       | MTR 14606         | 1                       | 2,23E+14   |
| MTR 14649           | 8                       | MTR 14651         | 8                       | MTR 14650         | 8                       | 2,23E+14   |
| MTR 14649           | 8                       | MTR 14655         | 9                       | MTR 14704         | 13                      | 2,23E+14   |
| MTR 14649           | 8                       | MTR 14604         | 2                       | MTR 14704         | 13                      | 2,22E+14   |
| MTR 14649           | 8                       | MTR 14613         | 2                       | MTR 14704         | 13                      | 2,22E+14   |
| MTR 14649           | 8                       | MTR 14703         | 13                      | MTR 14704         | 13                      | 2,22E+14   |
| MTR 14649           | 8                       | MTR 14655         | 9                       | MTR 14705         | 13                      | 1,55E+14   |
| MTR 14649           | 8                       | MTR 14703         | 13                      | MTR 14705         | 13                      | 1,54E+14   |
| MTR 14649           | 8                       | MTR 14604         | 2                       | MTR 14705         | 13                      | 1,54E+14   |
| MTR 14649           | 8                       | MTR 14613         | 2                       | MTR 14705         | 13                      | 1,54E+14   |
| MTR 14649           | 8                       | MTR 14651         | 8                       | MTR 14704         | 13                      | 1,54E+14   |
| MTR 14649           | 8                       | MTR 14651         | 8                       | MTR 14705         | 13                      | 8,60E+13   |
| MTR 14656           | 9                       | MTR 14642         | 6                       | MTR 14693         | 9                       | 3,33E+14   |
| MTR 14656           | 9                       | MTR 14658         | 9                       | MTR 14657         | 9                       | 3,31E+14   |
| MTR 14656           | 9                       | MTR 14658         | 9                       | MTR 14704         | 13                      | 3,31E+14   |
| MTR 14656           | 9                       | MTR 14642         | 6                       | MTR 14657         | 9                       | 2,64E+14   |
| MTR 14656           | 9                       | MTR 14642         | 6                       | MTR 14705         | 13                      | 1,95E+14   |
| MTR 14698           | 12                      | MTR 14701         | 12                      | MTR 14641         | 6                       | 4,83E+14   |
| MTR 14698           | 12                      | MTR 14703         | 13                      | MTR 14693         | 9                       | 2,78E+14   |
| MTR 14698           | 12                      | MTR 14604         | 2                       | MTR 14693         | 9                       | 2,78E+14   |
| MTR 14698           | 12                      | MTR 14613         | 2                       | MTR 14693         | 9                       | 2,78E+14   |
| MTR 14698           | 12                      | MTR 14703         | 13                      | MTR 14691         | 10                      | 2,78E+14   |
| MTR 14698           | 12                      | MTR 14604         | 2                       | MTR 14691         | 10                      | 2,78E+14   |

Cont. Anexo 2. Lista de filhotes e possíveis pares de pais com valores de LOD positivo. Identificação dos filhotes (Filhotes Id), identificação das fêmeas candidatas à maternidade (Fêmeas Id), identificação dos machos candidatos à paternidade (Machos Id), número dos cupinzeiros onde cada indivíduo foi identificado (N. do cupinzeiro) e valor de LOD para o trio composto por filhote, mãe e pai (LOD).

| <b>Filhotes Id.</b> | <b>N. do cupinzeiro</b> | <b>Fêmeas Id.</b> | <b>N. do cupinzeiro</b> | <b>Machos Id.</b> | <b>N. do cupinzeiro</b> | <b>LOD</b> |
|---------------------|-------------------------|-------------------|-------------------------|-------------------|-------------------------|------------|
| <b>MTR 14698</b>    | 12                      | MTR 14613         | 2                       | MTR 14691         | 10                      | 2,78E+14   |
| <b>MTR 14698</b>    | 12                      | MTR 14655         | 9                       | MTR 14693         | 9                       | 2,78E+14   |
| <b>MTR 14698</b>    | 12                      | MTR 14658         | 9                       | MTR 14606         | 1                       | 2,77E+14   |
| <b>MTR 14698</b>    | 12                      | MTR 14658         | 9                       | MTR 14691         | 10                      | 2,09E+14   |
| <b>MTR 14698</b>    | 12                      | MTR 14710         | 14                      | MTR 14691         | 10                      | 2,09E+14   |
| <b>MTR 14698</b>    | 12                      | MTR 14642         | 6                       | MTR 14691         | 10                      | 1,41E+14   |
| <b>MTR 14698</b>    | 12                      | MTR 14655         | 9                       | MTR 14641         | 6                       | 3,74E+13   |
| <b>MTR 14700</b>    | 12                      | MTR 14642         | 6                       | MTR 14647         | 7                       | 4,20E+14   |
| <b>MTR 14700</b>    | 12                      | MTR 14807         | 15                      | MTR 14647         | 7                       | 3,65E+13   |
| <b>MTR 14709</b>    | 14                      | MTR 14658         | 9                       | MTR 14693         | 9                       | 3,38E+14   |
| <b>MTR 14709</b>    | 14                      | MTR 14658         | 9                       | MTR 14705         | 13                      | 2,69E+14   |
| <b>MTR 14805</b>    | 15                      | MTR 14651         | 8                       | MTR 14693         | 9                       | 1,56E+14   |
| <b>MTR 14805</b>    | 15                      | MTR 14651         | 8                       | MTR 14657         | 9                       | 1,03E+14   |
| <b>MTR 14805</b>    | 15                      | MTR 14651         | 8                       | MTR 14699         | 12                      | 9,27E+13   |
| <b>MTR 14805</b>    | 15                      | MTR 14642         | 6                       | MTR 14691         | 10                      | 6,67E+13   |
| <b>MTR 14805</b>    | 15                      | MTR 14646         | 7                       | MTR 14711         | 14                      | 3,44E+13   |

## Biografia

---

Formou-se em bacharelado pela Universidade de São Paulo – USP no ano de 2016 e em licenciatura, também pela USP, no ano de 2017. Realizou, durante o período de graduação, um intercâmbio pelo programa “Ciências sem fronteiras”, oferecido pela CAPES e CNPq, na Australian National University - ANU, em Canberra - Austrália. Durante o período, participou de um projeto de pesquisa no laboratório de Biogeografia Evolutiva e Conservação, sob orientação do Professor Craig Moritz. Ao retornar para a USP, realizou uma iniciação científica no laboratório de herpetologia do Instituto de Biociências sob a orientação do professor Miguel Trefaut Rodrigues (2014-2016). Deu continuidade aos estudos com a realização desta dissertação.