

SELEÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES ANÔNIMOS E ESTUDOS DE DIVERSIDADE GENÉTICA DO LAGARTO PARTENOGENÉTICO AMEAÇADO DE EXTINÇÃO *Ameivula nativo*.

Natiely de Oliveira Silva¹; Rodrigo Marques Lima dos Santos²; Jessica Helena Gomes Ferreira³

1. Estudante do curso de Biologia; e-mail: Natiely_oliveira@hotmail.com
2. Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: santosrml@gmail.com

Área de conhecimento: **Genética Animal e Evolução**

Palavras-chaves: *Ameivula nativo*; Marcadores moleculares; Conservação.

INTRODUÇÃO

Ameivula nativo é um lagarto diurno, terrícola, de forrageamento ativo sobre a serrapilheira. É uma espécie diploide e destaca-se por ser o único de seu gênero a reproduzir-se partenogeneticamente. A partenogênese é um processo pelo qual o embrião, se desenvolve a partir de uma oosfera haploide ou diploide sem qualquer fusão de núcleos ou células, ou seja, sem que haja fecundação, e esta pode ocorrer de três formas distintas em vertebrados: a hibridogênese, a ginogênese e a partenogênese verdadeira. Há duas hipóteses propostas para explicar o surgimento da partenogênese em vertebrados, a hipótese de origem por hibridização e a hipótese da origem espontânea, ou também chamada de origem mutacional. A hipótese da origem híbrida é corroborada por muitos autores, com um grande número de representantes partenogenéticos, dentre eles, espécies da família Teiidae. Alguns autores ao analisar o cariótipo de *A. nativo* propuseram que sua origem foi hibridização, uma vez que, constataram a presença de três pares de cromossomos heteromórficos nesta espécie. Mais além, outros autores propuseram as espécies *A. ocellifera* e *G. abaetensis*, como suas possíveis parentais, fundamentando-se em distribuição geográfica, uma vez que ambas ocorrem simpatricamente nas restingas de Abaeté na Bahia; além disso, utilizaram caracteres como anomalias resultantes das diferenças de forma, posição ou número, de órgãos normalmente simétricos, para corroborar esta hipótese. Entretanto, para validar esta hipótese de origem híbrida, são necessários mais estudos genéticos e a confirmação das espécies parentais de *A. nativo*. Historicamente a família Teiidae manifesta problemas filogenéticos e taxonômicos no que diz respeito à definição do nível de gênero, e a fim de solucionar os polifiletismos dentro dessa família, gêneros novos foram propostos e outros revalidados, sendo que *Ameivula* é um desses novos gêneros, e este abrange a espécie *Ameivula nativo*. Atualmente o gênero *Ameivula*, foi averiguado como grupo não monofilético, e com o intuito de resolver este não-monofiletismo, instituíram o novo gênero *Glaucmastix*, distribuindo as espécies antes classificadas como *Ameivula*, entre esses dois gêneros, baseando-se em dados moleculares obtidos através de análises de apenas duas espécies distintas, sendo elas *A. ocellifera* e *G. abaetensis*, e também a partir de caracteres morfológicos, como por exemplo, ausência de esporas pré-anais, presença de grânulos na região supraorbitária, menos de 40 poros femorais, primeira superciliar dividida e ausência de projeção opercular da pele na margem anterodorsal, além de considerar a presença de uma listra vertebral clara e uma cauda na cor azul-verde brilhante como requisito para a delimitação do gênero. Este novo gênero abrange as espécies *Glaucmastix abaetensis*, *Glaucmastix cyanura*, *Glaucmastix littoralis* e *Glaucmastix venetacauda*, antes classificadas como

Ameivula, que pertencem ao grupo *A. littoralis*. As três espécies (*G. littoralis*, *A. nativo* e *G. abaetensis*) encontram-se na lista de espécies ameaçadas de extinção, passando de Vulnerável (VU), à espécies Em Perigo (EN), na recente lista de espécies ameaçadas de extinção. Todas são endêmicas das restingas da Mata Atlântica, habitats sob grande pressão antrópica, além de possuírem baixos números de registros, fatores que justificam a presença delas na lista.

OBJETIVO

Desenvolver uma biblioteca genômica de marcadores nucleares anônimos que possam ser empregados em estudos populacionais para *Ameivula nativo* e espécies filogeneticamente próximas.

METODOLOGIA

Para realização deste trabalho foram disponibilizadas amostras de tecidos preservados em álcool de 19 amostras de *A. nativo* e 5 amostras de espécies filogeneticamente próximas (2 de *A. ocellifera*, 2 de *G. abaetensis* e 1 de *G. littoralis*). No qual a extração do DNA foi realizada a partir do protocolo de extração de Acetato de Amônia, sendo posteriormente, as amostras quantificadas em gel de agarose à 2% utilizando o marcador de peso molecular *Low mass* para verificar a concentração de DNA de cada amostra extraída, as quais foram armazenadas em freezer à -20°C a uma concentração de aproximadamente 30 ng/μL. Foram utilizados *primers* previamente identificados por meio da construção e sequenciamento de uma biblioteca genômica via pirosequenciamento em um sistema 454 Roche GS FLX, a partir de dois indivíduos de *Ameivula nativo*, oriundos dos extremos de distribuição da espécie (Trancoso, BA e Regência, ES) e dos 36 potenciais marcadores anônimos gerados, dezesseis foram eleitos para serem testados neste estudo. Após a seleção dos marcadores, foram realizados testes para a padronização das condições de amplificação por PCR, partindo-se de um protocolo inicial padrão que estabelece as condições para um volume final de 15 μL, onde os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2% em solução tampão TBE 1X, corado em Gel Red™ Nucleic Acid (Biotium) e fotografado sob luz UV para confirmação da ocorrência de uma única banda e no tamanho esperado, e então foram, subseqüentemente, purificados utilizando o kit EXOSAP-ITTM. Os fragmentos de fita dupla foram sequenciados utilizando-se o sistema "Perkim Elmer ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction", em seguida, os produtos do sequenciamento foram purificados e precipitados e posteriormente as amostras foram estocadas em geladeira até serem processadas em sequenciador automático ABI Prism Genetic Analyser (3100) do Instituto de Ciências Biomédicas, USP. As sequências foram alinhadas e editadas no programa Codon Code Aligner Versão 7.1.2 e Bioedit v. 7.2.5, ainda no Codon Code foi observada a existência de códons de parada inesperados e problemas no quadro de leitura das regiões codificantes.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Após o teste de gradiente de temperatura, oito dos dezesseis marcadores amplificaram com as condições iniciais de PCR, e sete nas três variações de temperatura a que foram submetidos, sendo eles os marcadores denominados C, D, I, K, L, M e O, entretanto, o anônimo D amplificou apenas em uma das espécies testadas, podendo ser problemas com a amostra; e o anônimo H amplificou apenas nas temperaturas mais baixas em ambas as amostras testadas. Outros oito não amplificaram nessas mesmas condições (A, B, E, F, G, J,

N e P). A fim de ampliar a biblioteca genômica desta espécie, novos testes foram realizados alterando-se a concentração de DNA, ao qual os marcadores testados (A, B, E e F), foram submetidos a uma maior concentração do mesmo (2 µl), resultando na amplificação de apenas dois marcadores, os anônimos B e E. Com o mesmo intuito outros testes foram realizados, remodelando as concentrações de dNTP, e dos *primers*, *Foward* e *Reverse*, para 1,2 µl, e mantendo a maior concentração de DNA, no qual os anônimos G e J amplificaram nestas novas condições, apresentando bandas claras e bem definidas. Os resultados das análises de variação genética das sequências obtidas com os oito marcadores nucleares, totalizaram 3075 pb estudados. Os marcadores D, G, I, J e O apresentaram o nível polimórfico igual à zero, quando analisadas e comparadas as amostras de *A. nativo*. Já os marcadores C e M apresentaram sítios polimórficos, de 303 e 280 nucleotídeos respectivamente, quando comparados às espécies filogeneticamente próximas, e o marcador H apresentou variação de 292 nucleotídeos, entre a amostra 22 (*G. abaetensis*) e *A. nativo*, variação de 301 nucleotídeos, entre a amostra 23 (*G. abaetensis*) e *A. nativo*. Além disso, foi possível a visualização da variação de 353 nucleotídeos quando comparadas as duas amostras de *G. abaetensis*. Após o sequenciamento e comparação das amostras para todos os marcadores nucleares foram identificados um total de oito haplótipos, para os exemplares de *A. nativo* estudados, onde foi possível identificar que esta espécie possui baixa variabilidade genética, o que já era esperado, devido ao seu caráter partenogenético, pois essa é uma característica de espécies partenogenéticas, devido à produção de genomas idênticos aos da mãe, através da reprodução clonal. Além de apresentar baixa variabilidade genética, a maioria dos marcadores analisados se mostraram homocigotos em todo o fragmento, sendo, desde modo, representados por um único haplótipo cada. Portanto, segundo as análises, através de oito marcadores, *A. nativo* não possui uma tendência ou padrão claro de estruturação da variabilidade genética. Com este estudo também foi possível analisar as espécies classificadas como *A. aff nativo*, no qual as análises indicam que as cinco amostras podem ser realmente a espécie *A. nativo*. Em contrapartida, estas mesmas amostras foram descritas como sendo *Cnemidophorus xacriaba*, no qual as classificam desta forma, devido a esta espécie ser endêmica dos Planaltos dos Gerais, entretanto, acreditam em uma distribuição mais ampla para esta espécie, ocupando toda a região do Cerrado. De acordo com estas informações, as amostras mostraram uma ambiguidade, requisitando, portanto, novos testes para com as mesmas.

CONCLUSÃO

Dos dezesses marcadores moleculares testados, doze amplificaram na espécie *A. nativo*. Destes somente quatro amplificaram nas espécies filogeneticamente próximas. Portanto, são necessários novos testes com os demais para maior amplitude desta biblioteca genômica. A partir desta abordagem, baseada em PCRs e sequenciamento, é possível fornecer marcadores moleculares úteis para estudos populacionais, que em conjunto com outras abordagens como, morfológica, nos fornecem dados com maior confiabilidade sobre a biologia da espécie. Além disso, o sequenciamento dessas amostras e averiguação da presença de polimorfismos em *A. nativo* nessas regiões do DNA nos mostrou que esta é uma espécie com baixa variabilidade genética e baixo grau de diferenciação genética entre as espécies filogeneticamente próximas. Referente às amostras classificadas como *A. aff nativo* será necessário estudos mais amplos e detalhados, com abordagens morfológicas e moleculares, para uma definição mais concreta da descrição destas amostras, a fim de determinar a espécie a qual pertencem. Sendo ainda determinado o município de Linhares, uma possível região para manutenção e conservação da espécie *A. nativo*, e de outras espécies, devido ao seu alto potencial e suas florestas remanescentes, visando um aumento na diversidade genética desta e de outras espécies.

REFERÊNCIAS

ARIAS, F., CARVALHO, C. M., RODRIGUES, M. T. & ZAHER, H. Two new species of *Cnemidophorus* (Squamata: Teiidae) of the *C. ocellifer* group, from Bahia, Brazil. **Zootaxa**, v. 3022, p. 1-21, 2011b.

DIAS, Eduardo J. R.; ROCHA, Carlos D.; VRCIBRADIC, Davor. New *Cnemidophorus* (Squamata: Teiidae) from Bahia State, Northeastern Brazil. **Copeia**, v. 2002, n. 4, p 1070-1077. December 2002. Disponível em: http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/10566/1/2011_MarcileneFernandesAlmeidadosSantos.pdf. Acesso em: 12/07/2018.

GOICOECHEA, Noemí; FROST, Darrel R.; RIVA, Ignacio De la; PELLEGRINO, Katia C. M.; SITES JR, Jack; RODRIGUES, Miguel T.; PADIAL, José M.. Molecular systematics of teioid lizards (Teioidea/ Gymnophthalmoidea: Squamata) based on the analysis of 48 loci under tree-alignment and similarity-alignment. **Cladistics**. V. 32, n.6, p 624-671. December 2016.

MACHADO, Angelo B. M.; DRUMMOND, Gláucia M.; PAGLIA, Adriano P. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. Ministério do Meio Ambiente - MMA, Brasília. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 2008.

MENEZES, Vanderlaine A.; ROCHA, Carlos F. D. Geographic distribution, population densities and issues on conservation of whiptail lizards in restinga habitats along the eastern coast of Brazil. Northwestern. **Journal of Zoology**, v. 9, n. 2, p 337-344. June 2013.

MENEZES, Vanderlaine A.; ROCHA, Carlos F. D.; DUTRA, Guilherme F. Reproductive ecology of the parthenogenetic whiptail lizard *Cnemidophorus nativo* in a Brazilian restinga habitat. **Journal of Herpetology**, v. 38, n. 2, p 280-282. June 2004.

PASSAMANI, Marcelo; MENDES, Sérgio L. **Espécies da fauna ameaçadas de extinção no estado do Espírito Santo**. Instituto de Pesquisas da Mata Atlântica, Vitória: Ipema 2007. Disponível em: [Espécies_da_fauna_ameaçadas_de_extinção_no_Estado_do_Espírito_Santo](#) Acesso em: 18/04/2017.

PELOSO, Pedro L. V.; ROCHA, Carlos F. D.; PAVAN, Sílvia E.; MENDES, Sérgio L. Activity and microhabitat use by the endemic whiptail lizard, *Cnemidophorus nativo* (Teiidae), in a restinga habitat (Setiba) in the state of Espírito Santo, Brazil. **South American Journal of Herpetology**, v. 3, n. 2, p 89-95. August 2008.

PORTARIA MMA nº444 de 17 de dezembro de 2014. **Espécies terrestres e mamíferos aquáticos**. Disponível em: http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/biodiversidade/fauna-brasileira/avaliacao-do-risco/PORTARIA_N%C2%BA_444_DE_17_DE_DEZEMBRO_DE_2014.pdf.

ROCHA, Carlos F. D.; BERGALLO, H. G.; PECCININI-SEALE, D. Evidence of an unisexual population of the Brazilian whiptail lizard genus *Cnemidophorus* (Teiidae), with description of a new species. **Herpetologica**, p. 374-382, 1997.

SANTOS, Régis V. S.; DE-CARVALHO, Crizanto B.; FREITAS, Evellyn B. de; GUEIROS, Fernanda B.; FARIA, Renato G. Uso dos recursos por duas espécies simpátricas de *ameivula*

(Squamata: Teiidae) em um ecótono de Mata Atlântica-Caatinga. **Acta biol. Colomb.**, v. 20, n. 1, p 67-77. April 2015.