



Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
Coordenação de Capacitação
Divisão Apoio Técnico

PIBIC

2.371

PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DO INPA
RELATÓRIO FINAL

**DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DA VARIABILIDADE GENÉTICA DO
LAGARTO *Ameiva ameiva* NO INTERFLÚVIO PURUS-MADEIRA.**

BOLSISTA: Thais Mayumi Macedo Higa

ORIENTADOR(A): Fernanda de Pinho Werneck

Relatório Final apresentado ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, como requisito para a conclusão como participante do Programa de Iniciação Científica do INPA.

Manaus – Amazonas
2017

Apoio Financeiro:



Realização:



Distribuição espacial da variabilidade genética do lagarto *Ameiva ameiva* no interflúvio Purus-Madeira

Resumo

O lagarto *Ameiva ameiva* tem ampla distribuição desde a Costa Rica até o norte da Argentina e na mais ampla gama de ecorregiões para qualquer espécie de lagarto, incluindo a Floresta Amazônica, Mata Atlântica, Caatinga e Cerrado. Os estudos sobre *A. ameiva* em sua maioria envolvem ecologia geográfica da espécie os tipos de ambientes que habitam e estratégias reprodutivas e recentemente realizou-se uma pesquisa em escala geográfica ampla sobre a diversidade intraespecífica e história filogeográfica da espécie. Nunca se fez uma pesquisa com a diversidade genética da espécie em escala geográfica fina e principalmente no interflúvio Purus-Madeira, então este projeto vem com o objetivo de investigar a existência de estrutura genética populacional e os padrões de distribuição da diversidade genética de *A. ameiva* ao longo do interflúvio Purus-Madeira. Foram coletadas 47 amostras ao longo da BR-319. A extração do DNA foi feita com o kit Wizard Promega, a amplificação do gene ND2 foi feita via PCR, purificado com peg 8000 e sequenciado no ABI 3130. Para inferir relações filogenéticas usou-se o programa RaxML e Mr.Bayes. Para estimar a estrutura populacional foi utilizado o programa BAPS5. A sequência final apresentou 645 bp de 16 indivíduos. As inferências filogenéticas apresentam baixo suporte nodal em ambos os métodos. Enquanto nas análises feitas no programa BAPS mostrou a existência de três populações distintas. Foi possível observar que a espécie apresentou variabilidade genética ao longo do interflúvio Purus-Madeira.

Palavras Chave: *Ameiva ameiva*, variabilidade genética, interflúvio Purus-Madeira

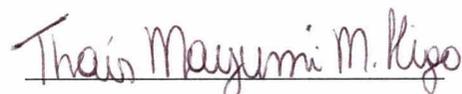
Subárea: Genética

Financiamento : PAIC/FAPEAM

Data: 30 / 11 / 17


Orientador(a)

Fernanda P. Werneck, PhD
Pesquisadora Adjunta - INPA
Vice-Curadora, Coleção Herpetológica


Bolsista

INTRODUÇÃO

Os padrões de distribuição espacial da diversidade genética intraespecífica podem ser influenciados por fatores históricos, como ocorrência de barreiras geomorfológicas ao fluxo gênico, e por fatores ecológicos, como interações entre características da paisagem e processos microevolutivos (Manel et al., 2003). Assim, o entendimento da distribuição da diversidade genética intraespecífica é importante para detectar padrões como: diversidade críptica e delimitação de potenciais espécies desconhecidas (Fouquet et al., 2007; Werneck et al., 2012), efeito de processos biogeográficos na estruturação genética (Werneck et al., 2012) e correlação entre descontinuidades genéticas e características ambientais da paisagem (Manel & Holderegger, 2013), com diversas implicações para a taxonomia, biogeografia e genética da conservação. A distância geográfica pode gerar variação genética em populações de vários organismos (Eckert et al., 2008), incluindo lagartos (Giugliano et al., 2007). Além disso, fatores ambientais podem ser identificados como determinantes na diferença de estrutura genética de alguns organismos (Rellstab et al., 2015).

A região Neotropical compreende do sul do México ao sul da América do Sul, incluindo as ilhas do mar do Caribe (Ayres et al., 2005). Essa região ocupa 16% da superfície do planeta, das quais 57% são ocupadas por florestas tropicais (Ayres et al., 2005). Nela existe uma imensa biodiversidade, que abrange cerca de metade de todas as espécies de plantas e animais (Brandon et al., 2005). O Brasil detém cerca de $\frac{1}{3}$ de todos os remanescentes de florestas tropicais do mundo, distribuídos na Amazônia e na região costeira Atlântica (Ayres et al., 2005).

A Floresta Amazônica é a maior floresta tropical do mundo, sua extensão geográfica ocupa cerca de 50% do território nacional e a riqueza da fauna de lagartos na Amazônia é a maior entre os biomas brasileiros (Rodrigues, 2005). São conhecidas cerca de 150 espécies de lagartos na Amazônia brasileira (<http://www.museu-goeldi.br/censo/>). Na porção central da Amazônia brasileira está localizado o interflúvio Purus-Madeira, que ocupa uma área de 15,4 milhões de hectares. Este interflúvio é entrecortado por centenas de pequenos rios e igarapés e suas nascentes se encontram na mesma área da rodovia federal BR-319, que interliga Manaus a Humaitá e Porto Velho (Maldonado et al., 2012). Para esta região, existem poucos estudos que abordam questões relacionadas à diversidade genética para as espécies animais e vegetais (Yépez, 2016).

Para a região do interflúvio Purus-Madeira, não existe nenhum estudo relacionado à diversidade genética de lagartos, e nem mesmo à história natural deste grupo taxonômico. Amostragens de lagartos realizadas no interflúvio registraram a ocorrência da espécie *Ameiva ameiva*, indicando que esta espécie está amplamente distribuída ao longo do interflúvio (dados não publicados). A espécie *A. ameiva* é um dos lagartos Neotropicais com a maior distribuição geográfica ocorrendo desde a Costa Rica até o norte da Argentina (Vitt & Colli, 1994). Ocorre na mais ampla gama de ecorregiões para qualquer espécie de lagarto, incluindo a Floresta Amazônica, Mata Atlântica, Caatinga e Cerrado (Tucker, 2016).

No geral, existem mais pesquisas sobre *A. ameiva* no que diz respeito à ecologia geográfica da espécie (Vitt & Colli, 1994), os tipos de ambientes que habitam e estratégias reprodutivas (Vitt, 1982). Pesquisa recente investigando a diversificação intraespecífica e história filogeográfica da espécie, foi realizada em uma escala geográfica mais ampla, incluindo amostras de vários países e vários biomas do Brasil (Tucker, 2016). No entanto, até o momento nenhum estudo avaliou a variabilidade genética em relação à distribuição espacial da espécie em uma escala geográfica fina, principalmente na Amazônia. Assim, não se sabe que fatores podem afetar a estrutura genética da *A. ameiva* em escalas geográficas regionais.

Tucker (2016) afirma que uma grande variedade de lagartos que foram previamente considerados como monotípicos vem provando ser um complexo de espécies, e a espécie *Ameiva ameiva* com diversidade taxonômica negligenciada. Nesse contexto, esse projeto tem como objetivo investigar a existência de estrutura genética populacional e os padrões de distribuição da diversidade genética de *A. ameiva* ao longo do interflúvio Purus-Madeira.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

A BR-319 corta o interflúvio Purus-Madeira na direção sudoeste-nordeste. O interflúvio apresenta Floresta Ombrófila Densa de Terras Baixas ao norte e mais ao sul, perto de Humaitá e Porto Velho, Floresta Ombrófila Aberta de Terras Baixas, com solo predominantemente podzólico vermelho-amarelo. A sua temperatura media anual é de 27°C e a precipitação está em cerca de 2000mm na porção norte, 2500mm na porção central e 1500mm no sul (Maldonado *et al.*, 2012).

O delineamento amostral compreende 11 módulos amostrais na região do interflúvio Purus-Madeira, distribuídos ao longo da BR-319, na Amazônia Central (Figura 1). Estes módulos fazem parte de um modelo de levantamento sistemático e integrado de variáveis bióticas e abióticas para a Amazônia, o RAPELD (<http://inpa.ppbio.gov.br>). O sistema RAPELD permite a comparação dos resultados entre diferentes localidades e grupos biológicos, tendo sido adotado na investigação de questões em ecologia e biogeografia de diferentes táxons (Magnusson *et al.*, 2013).

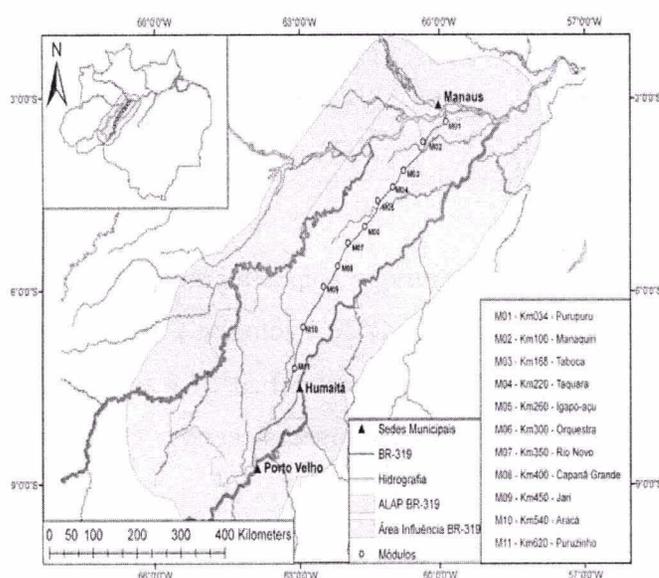


Figura 1: Módulos de coleta do sistema RAPELD, ao longo da BR-319. Fonte: <https://ppbio.inpa.gov.br/sitios/br319>

Coleta de dados

Foram coletadas 47 amostras de tecido de *A. ameiva* em 10 módulos da BR-319 (Tabela 1), em expedições realizadas previamente ao longo dos módulos do sistema RAPELD (Figura 1), não foi possível obter amostras do módulo 3 (Km168 - Taboca). O tecido muscular ou fígado foi preservado em etanol 95% e a extração do DNA foi realizada utilizando o Kit Wizard Promega. A amplificação do gene mitocondrial NADH dehydrogenase subunit 2 (ND2), foi realizada usando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).

Tabela 1. Número de amostras da espécie *Ameiva ameiva* coletadas nos módulos da BR-319 em expedição previamente realizada. Não foi realizada coleta de amostras no módulo 3.

Módulos	Módulo 1	Módulo 2	Módulo 4	Módulo 5	Módulo 6	Módulo 7	Módulo 8	Módulo 9	Módulo 10	Módulo 11
Número de amostras coletadas	5	5	4	5	5	5	4	2	7	5

Para a PCR do gene ND2 foram utilizados os primers L4437 e H567b, seguindo o protocolo de Tucker (2016): desnaturação por 2 minutos à 95°C, seguido por 32 ciclos de 35 segundos à 95°, 35 segundos à 52°C e 35 segundos à 72°C, finalizando com 10 segundos à 72°C. A purificação foi realizada utilizando PEG 8000. O sequenciamento foi feito utilizando o Applied Biosystems 3130 (ABI 3130).

Análise de dados

Depois da coleta de dados em laboratório as sequências foram editadas com o programa Geneious 5.4 (Drummond et al., 2011) e foram alinhadas com o programa Aliview (Larsson, 2014). Foram realizadas análises de Máxima Verossimilhança, com o programa RaxML (Stamatakis et al., 2008) e Inferência Bayesiana com o programa MrBayes (Huelsenbeck et al., 2001) para inferir as relações filogenéticas entre as amostras. Para estimar a estrutura populacional (i.e., número de agrupamentos populacionais genéticos – k e a classificação das amostras/indivíduos nos agrupamentos inferidos) foi utilizado o método de agrupamento Bayesiano, com o programa BAPS5 (Corander et al., 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Depois de editado e alinhado o alinhamento final do gene ND2 apresentou 645 bp de um total de 16 indivíduos coletados no interflúvio (Figura 2), não foi possível incluir amostras dos Módulos 2, 8 e 9 nas análises devido à baixa qualidade do sequenciamento das amostras dos módulos.

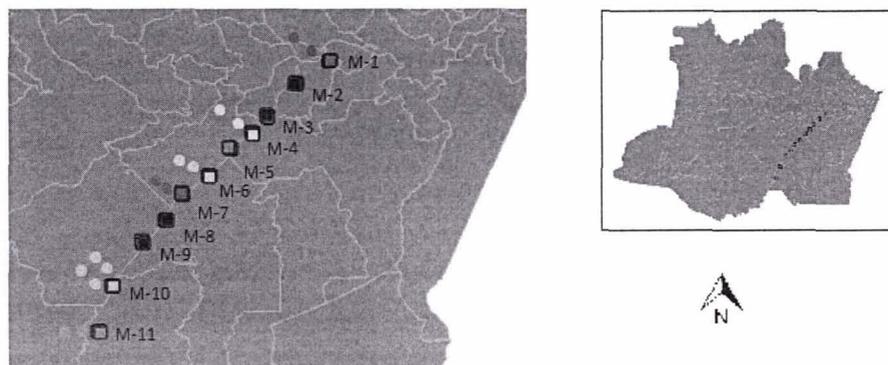


Figura 2: Distribuição geográfica dos indivíduos coletados de *Ameiva ameiva* ao longo do Sistema RAPELD no interflúvio Purus-Madeira que foram usados na sequência alinhada. Onde “M” representa os Módulos e os pontos coloridos representam a quantidade de indivíduos por módulo.

As análises no RAxML (Figura 3, A) apresentaram um suporte nodal baixo, onde apenas dois clados possuem suporte acima de 80, enquanto na análise do programa MrBayes (Figura 3, B) podemos observar que um número maior de nós possuem probabilidades posteriores acima de 0,80. Em ambas as análises as amostras APL21594 e APL21557 estão no mesmo clado, sendo que as amostras pertencem ao Módulo 10 e 4, respectivamente, a uma distância de 320 km entre módulos. Enquanto amostras do mesmo módulo, como APL21603 e APL21604 estão em clados diferenciados, ou no mesmo clado como é possível observar nas amostras APL21580 e APL21581, que pertencem ao Módulo 11.

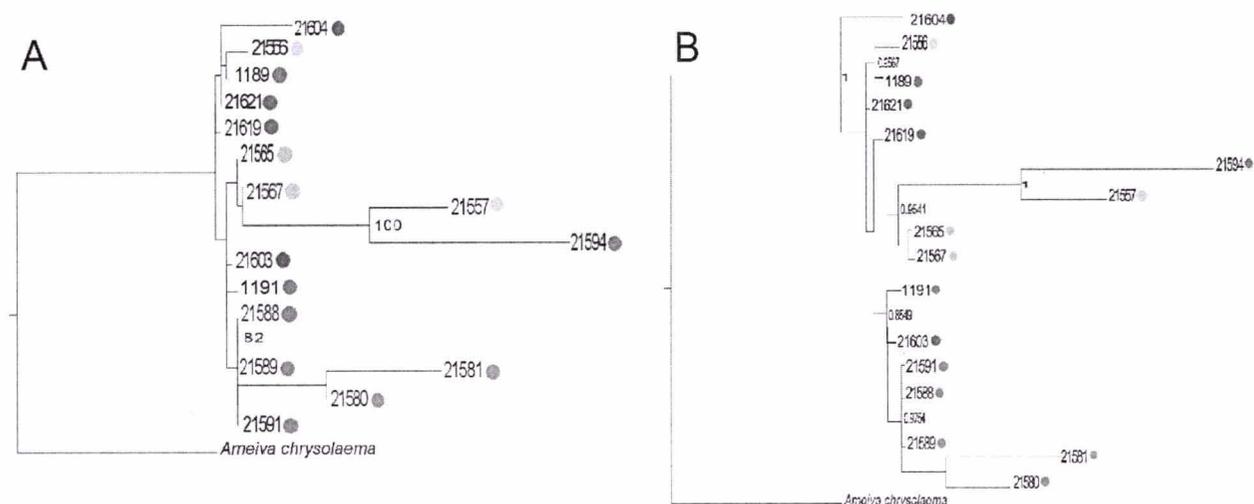


Figura 3: Árvores filogenéticas estimadas para a espécie *Ameiva ameiva* a partir de um alinhamento de 645 bp do gene ND2 com base em máxima verossimilhança (A) e inferência Bayesiana (B). O ponto ao lado do número das amostras representa os Módulos a que pertencem, sendo: azul = Módulo 1; amarelo = Módulo 4; roxo = Módulo 5; rosa = Módulo 6; vermelho = Módulo 7; verde = Módulo 10 e marrom = Módulo 11, conforme Figura 2. Suportes nodais abaixo de 80 (A) e 0,80 (B) não foram incluídos na figura.

Devido ao baixo suporte dos nós, infere-se que as amostras sejam muito próximas filogeneticamente, apesar de haver claras divergências em alguns pontos com alto suporte, no entanto Tucker (2016) separou suas amostras da Amazônia em três grandes clados bem próximos a área de estudo, o que deve ser levado em conta para afirmar a variabilidade genética da espécie na região da Amazônia.

A estrutura populacional obtida como resultado das análises feitas no BAPS (Figura 3), aponta a existência de três populações distintas. Amostras dos Módulos 1, 4, 5, 6, 7 e 10 fazem parte da mesma população o que aponta pouca diversidade genética entre os módulos. Com exceção de um indivíduo do Módulo 4 (APL21557) e um indivíduo do Módulo 10 (APL21594) estão na mesma população, confirmando os resultados já visto nas análises do RaxML e MrBayes, onde ambos participavam do mesmo clado apesar da distância geográfica de mais de 300 km. Algumas populações do trabalho de Tucker (2016) também apresentaram grande distância geográfica entre indivíduos do mesmo clado. Outra exceção é o indivíduo APL21581 que pertence ao Módulo 11

junto com a amostra APL21580, no entanto estão em populações diferentes, no entanto estavam no mesmo clado nas análises anteriores.

2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1	2	2	2
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5	5	5	5	5	6	5	6	8	6	5	5	9	5	5	6
8	9	9	5	8	0	5	1	9	2	6	6	1	8	8	0
1	4	1	7	0	4	6	9		1	5	7		8	9	3
M11	M10	M10	M4	M11	M7	M4	M5	M1	M5	M6	M6	M1	M10	M10	M7

Figura 4: Estrutura populacional da espécie *Ameiva ameiva* distribuídos ao longo dos Módulos do Sistema RAPELD na BR-319 gerada pelo programas BAPs. Onde “M” representa o módulo a qual a amostra pertence.

Em uma análise feita no BAPs (Figura 5) considerando as possíveis misturas genéticas, podemos ver que a amostra APL21591 do Módulo 11 não é inteiramente de uma população, mas possui traços da população da amostra APL21581 do Módulo 10, geograficamente próximas da uma da outra, do ponto de vista filogenético estão bem próximas segundo as análises de Máxima Verossimilhança e de Inferência Bayesiana. O mesmo padrão foi observado no trabalho de Yépez (2016) com anuros, que constatou que o essa zona de contato entre populações que ocupam regiões ambientais distintas acontece no encontro entre floresta ombrófila densa e floresta ombrófila aberta. Nota-se então, que o Módulo 10 apresenta três populações diferentes, uma puramente verde, uma vermelha e uma com mistura genética da população azul.

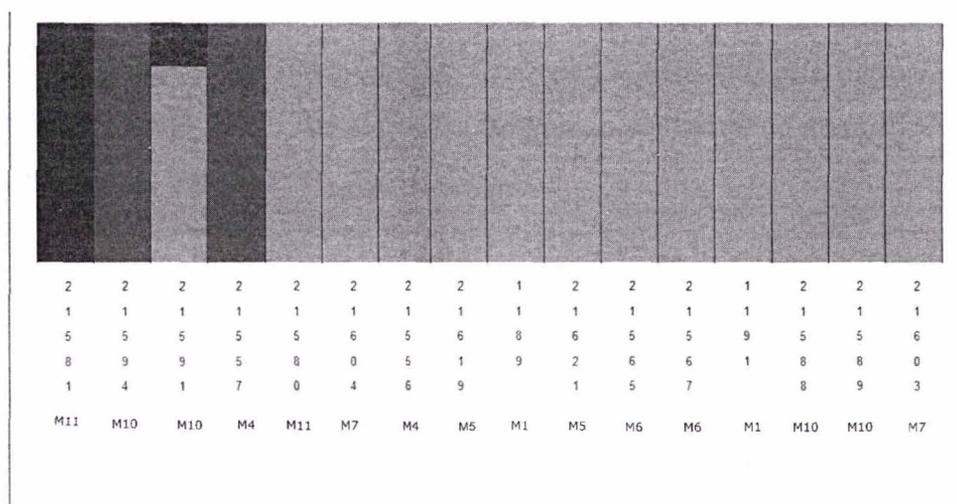


Figura 5: Estrutura populacional da espécie *Ameiva ameiva* distribuídos ao longo dos Módulos do Sistema RAPELD na BR-319 realizada pelo programa BAPs, considerando mistura genética entre as populações. Onde “M” representa o módulo a qual a amostra pertence.

CONCLUSÃO

Deve-se lembrar que os resultados apresentados neste trabalho são baseados em sequências com baixa qualidade, no entanto foi possível observar que a espécie *Ameiva ameiva* apresentou variabilidade genética em relação aos módulos do interflúvio Purus-Madeira, podendo ser separada em no mínimo três populações. É possível que estruturação populacional adicional tivesse sido recuperadas se o banco de dados completo com todas as 47 amostras coletadas na BR-319 tivesse sido obtido. Além disso, o baixo suporte nodal nas inferências filogenéticas com base em Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana pode ter sido influenciado pela baixa quantidade e proximidade das amostras.

No entanto, o projeto vem para enfatizar a importância de se desenvolver mais projetos com a espécie, seja em escala geográfica fina ou ampla, e não apenas abrangendo o interflúvio Purus-Madeira, mas também todo o Amazonas, para que se entenda cada vez mais sobre a sua distribuição da variabilidade genética da espécie.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo financiamento para este projeto e do projeto da Dr. Fernanda Werneck. Ao Instituto Nacional de Pesquisas do Amazonas (INPA) e ao Laboratório Temático de Biologia Molecular (LTBM) pelo

espaço para realizar as atividades do projeto. Ao Programa de Pesquisa em Biodiversidade (PPBio) e ao Centro de Estudos Integrados da Biodiversidade Amazônica (CENBAM) pelo financiamento para a coleta das amostras na BR-319. E aos alunos de mestrado e doutorado do grupo EBBA que me ajudaram durante todo esse projeto.

REFERÊNCIAS

- Ayres, J.M.; Fonseca, G.A.B.; Rylandas, A.B.; Queiroz, H.L.; Pinto, L.P.; Masterson, D.; Cavalcanti, R.B. 2005. *Os corredores ecológicos das florestas tropicais do Brasil*. Sociedade Civil Mamirauá, 256p.
- Brandon, K.; Fonseca, G.A.B.; Rylands, A.B.; Silva, J.M.A.C. 2005. Conservação brasileira: desafios e oportunidades. *Megadiversidade*, 1: 7-13.
- Corander, J.; Marttinen, P.; Sirén, J. Tang, J. 2008. Enhanced Bayesian modeling in BAPS software for learning genetic structure of populations. *BMC Informatics* 9: 539-552.
- Drummond, A.J.; Ashton, B.; Buxton, S.; Cheung, M.; Cooper, A.; Duran, C.; *et al.* 2011. *Geneious v5.4*, Disponível em: www.geneious.com.
- Eckert, C.G.; Samis, K.E; Loucheed, S.C. 2008. Genetic variation across species' geographical ranges: the central-marginal hypothesis and beyond. *Molecular Ecology*, 17:1170-1188.
- Giugliano, L.G.; Colli, G.R., Collevatti, R.G. 2007. Molecular dating and phylogenetic relationships among Teiidae (Squamata) inferred by molecular and morphological data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 45: 168-179.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17:754.
- Larsson, A., (2014) AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics*, 30 n. 22, p. 3276-327
- Magnusson, W.E.; Pezzini, R.B.B.; Baccaro, F.F.; Bergallo, F.; Penha, H.; Rodrigues, J.; *et al.* 2013. Biodiversidade e Monitoramento Ambiental Integrado: o sistema RAPELD na Amazônia. 1ª ed. Santo André - SP: Publisher Attema. 335p.
- Maldonado, F.D.; Keizer, P.M.; Graça, L.A.; Fearnside, P.M.; Vitel. C.S. 2012. Previsão temporal da distribuição espacial do desmatamento no interflúvio PurusMadeira até o ano 2050. In: W.C.

- de Sousa Junior, A.V. Waichman, P.A.A. Sinisgalli, C.F. de Angelis & A.R. Romeiro (Ed.) *Rio Purus: Água, Território e Sociedade na Amazônia Sul-Occidental*. LibriMundi, Goiânia, Goiás. p. 183-196.
- Manel, S.; Holderegger, R. 2013. Ten years of landscape genetics. *Trends in Ecology and Evolution*, 28: 614-621.
- Manel, S; Schwartz, M.K.; Luikart, G.; Taberlet, P. 2003. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology and Evolution*, 18(4): 189-197.
- Rellstab, C.; Gugerli, F.; Eckert, A. J.; Hancock, A.M.; Holderegger. 2015. A practical guide to environmental association analysis in landscape genomics. *Molecular Ecology*, 24: 4348-4370.
- Rodrigues, M. T. 2005. Conservação dos répteis brasileiros: os desafios para um país megadiverso. *Megadiversidade*, 1: 87-94.
- Stamatakis, A.; Hoover, P.; Rougemont, J. 2008. A Rapid Bootstrap Algorithm for the RAxML Web-Servers. *Systematic Biology*, 57: 758-771.
- Tucker, D.B. 2016. *Molecular Studies of South American Teiid Lizards (Teiidae: Squamata) from Deep Time to Shallow Divergences*. Tese de Doutorado, Brigham Young University, Provo, Utah, Estados Unidos. 2016. 132p.
- Vitt, L.J. 2011. Reproductive tactics of *Ameiva ameiva* (Lacertilia: Teiidae) in a seasonally fluctuating tropical habitat. *Canadian Journal of Zoology*, 60(12):3113-3120.
- Vitt, L.J.; Colli, G. R. 1994. Geographical ecology of a Neotropical lizard: *Ameiva ameiva* (Teiidae) in Brazil. *Canadian Journal of Zoology*, 72: 1986-2008.
- Werneck, F.P.; Gamble, T.; Colli, G.R.; Rodrigues, M.T.; Sites Jr., J.W. 2012. Deep diversification and long-term persistence in the South America 'dry diagonal: integrating continent-wider phylogeography and distribution modeling of geckos. *Evolution*, 66: 3014-3034.
- Yépez, D.A.O. 2016. *Estrutura populacional intraespecífica e diversidade genética de *Osteocephalus taurinus* (Anura: Hylidae) no interflúvio Purus-Madeira, Amazônia Central*. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. 59p.