



JULIANA CONTE ZANOTELLI

Estudo Filogeográfico de *Cnemidophorus vacariensis* Feltrim & Lema, 2000 baseado no DNA mitocondrial e diferenciação morfológica de suas populações (SQUAMATA: SAURIA: TEIIDAE).

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Área de Concentração: Biologia Comparada

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Laura Verrastro

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

PORTO ALEGRE

2010

Estudo Filogeográfico de *Cnemidophorus vacariensis* Feltrim & Lema, 2000 baseado no
DNA mitocondrial e diferenciação morfológica de suas populações
(SQUAMATA: SAURIA: TEIIDAE).

JULIANA CONTE ZANOTELLI

Aprovada por:

Dr^a. Lílian Gimenes Giugliano

Dr^a. Loreta Brandão de Freitas

Dr. Márcio Borges Martins

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Porto Alegre

2010

*Junte um bico com dez unhas
Quatro patas, trinta dentes
E o valente dos valentes
Ainda vai te respeitar*

(...)

*Esperteza, Paciência
Lealdade, Teimosia
E mais dia, menos dia
A lei da selva vai mudar*

*Todos juntos somos fortes
Somos flecha e somos arco
Todos nós no mesmo barco
Não há nada pra temer.*

(Os Saltimbancos - Todos Juntos)

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado com a ajuda de muitas pessoas e instituições, sem as quais ele sequer teria saído do papel. De coração, agradeço a todos vocês.

À Prof^a Laura Verrastro, pela amizade e confiança, que remontam aos tempos da graduação.

Ao Prof^a Eduardo Eizirik, pela oportunidade de executar este projeto sob sua orientação.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela bolsa concedida.

À BAESA – Energética Barra Grande S/A, pelo financiamento deste projeto através do “Programa de Monitoramento da fauna pós-enchimento do Reservatório da Área de Influência do AHE Barra Grande” em convênio entre a empresa e o Instituto de Biociências/UFRGS.

À Carolzinha, que me apresentou aos estudos filogeográficos.

Aos ajudantes de campo (Carol Zank, Angelo, Lui, Na, Mi, Geisa, Renata Vieira, Carolzinha, Patrick, Déia Turcati, Raquel Santos, Alfredo, Rafa Balestrim, José Balestrim, Santiago, Rodrigo Delani), principalmente ao Martin, que teve participação fundamental em *todas* as coletas.

Aos amigos do Laboratório de Herpetologia da UFRGS.

Ao Augusto, pela ajuda com as análises de máxima parcimônia.

Ao Daniel, por me enviar o mapa do RS super detalhado que eu precisava pra descobrir o nome dos rios e arroios que dividiam as populações dos lagartinhos.

Ao Rodrigo Caruccio, pelas informações sobre coleta e recaptura dos lagartos durante os campos do seu mestrado.

Aos donos das terras onde procuramos pelos lagartos e que autorizaram nossa entrada em sua propriedade.

Aos motoristas Sandro, seu Darci, seu Luis e Braga, que nos conduziram com segurança e, *quase* sempre, fizeram nossas viagens mais divertidas.

Ao Prof^o Márcio Borges Martins e à Caroline Zank, pela ajuda na elaboração da modelagem de nicho ecológico de *C. vacariensis*.

Ao Prof^o Márcio, também pelas valiosas contribuições ao longo deste trabalho.

À Carol Zank, pela ajuda na confecção do mapa dos pontos de coleta.

Ao Prof^o Malabarba e aos colegas da ictio, por emprestar a lupa e a câmera para as fotos dos lagartos. E ao Saulo e à Julia, por me ajudar a fazer tudo funcionar.

À Prof^a Paula e à Helena, por emprestar a câmera e fazer as fotos das cabeças dos lagartinhos. Só quem bate foto de tatuzinho mesmo pra conseguir...

À Gláucia M. F. Pontes, curadora da coleção herpetológica do Museu de Ciências Naturais da PUCRS, pela permissão de examinar o holótipo e parátipos de *C. vacariensis*.

À Lílian G. Giugliano, pela doação de alíquotas de primers utilizados nos testes iniciais deste projeto, pelo envio da sua tese de doutorado que foi importante na finalização deste trabalho e por gentilmente esclarecer as minhas dúvidas, quando a procurei.

Ao Renato Bérnils, por informar os pontos onde registrou *C. vacariensis* em Candói/PR e em Capão Alto/SC.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular e Genômica da PUCRS, sempre solícitos quando precisei. Em especial à Cladi, que faz tudo funcionar.

À Larissa R. de Oliveira, que iniciou as análises moleculares deste trabalho.

À Tatiane Trigo, por me ensinar as técnicas de um laboratório de biologia molecular e por analisar boa parte das nossas amostras.

À Ale, por me ensinar a mexer no PhredPhrap.

Ao Manoel, por ajudar a quebrar os galhos informáticos, e também genéticos.

Ao Lucas, pela ajuda com as análises de estruturação populacional.

À Mirian, pela enorme dedicação e carinho com as quais me ajudou a rodar as análises filogenéticas, e também pela revisão da dissertação.

A Cris Trinca, Gabi Fernandez e Manuel, pelas opiniões sobre as relações que a rede de haplótipos mostrou.

Ao Felipe Grazziotin, pelos esclarecimentos sobre a tradução do 12S/16S, sugestão de análises e indicação de papers.

Ao Prof^o Leandro, pela ajuda com as análises estatísticas.

Ao Lui, pela ajuda estatística e com os mapas, pela revisão da dissertação e pelas sugestões pra discussão.

Ao Angelo, pela ajuda no laboratório. E por todo o amor e amizade.

Ao Tiago, por ser um irmão querido e me emprestar o quarto pra escrever essa dissertação.

À minha mãe e ao meu pai queridos, pelo apoio durante todos esses anos de estudo.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	iv
Lista de Tabelas	v
Resumo	vi
I. Introdução	1
I. 1. O gênero <i>Cnemidophorus</i>	1
I. 2. <i>Cnemidophorus vacariensis</i>	2
I. 3. Os estudos filogeográficos	4
I. 4. A filogeografia e a conservação	5
II. Objetivos	6
II.1. Objetivos específicos	6
III. Justificativa	6
IV. Material e Métodos	7
IV. 1. Área de estudo	7
IV. 2. Coleta dos animais	10
IV. 3. Análises Moleculares	13
IV. 4. Análises Morfológicas	18
V. Resultados	20
V. 1. Coleta dos animais	20
V. 2. Análises Moleculares	22
V. 3. Análises Morfológicas	29
VI. Discussão	35
VI. 1. Diversidade molecular e testes de neutralidade	35
VI. 2. Estruturação populacional	36
VI. 3. Biogeografia	38
VI. 4. Conservação	40
VII. Referências Bibliográficas	44
VIII. Anexos	vii
Anexo I – Material examinado	viii
Anexo II – Protocolo de extração de DNA com fenol-clorofórmio	x
Anexo III – Programa para amplificação por PCR	xi
Anexo IV – Exemplares de <i>C. vacariensis</i> sequenciados e analisados	xii

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Fêmea adulta de <i>Cnemidophorus vacariensis</i> procedente de Bom Jesus, RS ..	3
Figura 2.	Campos de Cima da Serra – ambiente típico de ocorrência de <i>Cnemidophorus vacariensis</i> . Vacaria, RS	8
Figura 3.	Mapa dos domínios morfoclimáticos brasileiros	9
Figura 4.	Localização geográfica dos pontos de coleta dos exemplares de <i>Cnemidophorus vacariensis</i> ao longo da sua área de ocorrência	12
Figura 5.	Mapa de modelagem de nicho ecológico para <i>Cnemidophorus vacariensis</i> com sua probabilidade de ocorrência	21
Figura 6.	Rede de haplótipos dos genes 12S e 16S concatenados para 58 indivíduos de <i>Cnemidophorus vacariensis</i> e grupo externo	23
Figura 7.	Gráficos da distribuição dos <i>mismatches</i> para os genes 12S e 16S concatenados.....	26
Figura 8.	Relações filogenéticas recuperadas para <i>Cnemidophorus vacariensis</i> por análise Bayesiana (melhor árvore)	28
Figura 9.	Diagrama representando os dois primeiros eixos da análise de redundância baseada nos caracteres morfológicos e localidades de coleta de <i>Cnemidophorus vacariensis</i>	31
Figura 10.	Vista dorsal da cabeça de exemplares de <i>Cnemidophorus vacariensis</i> provenientes de Candói, PR	32
Figura 11.	Diagrama representando os dois primeiros componentes da análise de componentes principais baseada nos caracteres morfológicos de <i>Cnemidophorus vacariensis</i>	33
Figura 12.	Gráficos de dispersão das contagens das escamas dorsais transversais e longitudinais por local de procedência das amostras de <i>Cnemidophorus vacariensis</i>	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Data, localidades, coordenadas geográficas dos pontos de coleta e número de tombo dos exemplares de <i>Cnemidophorus vacariensis</i> coletados	12
Tabela 2. Número de exemplares de <i>Cnemidophorus vacariensis</i> , por procedência, usados nas análises genéticas	15
Tabela 3. Indivíduos de <i>Cnemidophorus vacariensis</i> representantes de cada haplótipo encontrado e exemplares retirados das análises filogenéticas, com sua procedência	17
Tabela 4. Variáveis consideradas e percentual de contribuição de cada uma delas na modelagem de nicho ecológico de <i>Cnemidophorus vacariensis</i>	21
Tabela 5. Resultados da AMOVA para <i>Cnemidophorus vacariensis</i>	24
Tabela 6. Comparações par-a-par dos valores de F_{ST} obtidos a partir da distância entre os haplótipos dos genes 12S e 16S concatenados entre as populações amostradas de <i>Cnemidophorus vacariensis</i>	25
Tabela 7. Resultados das análises de diversidade para os genes 12S e 16S (individuais e de forma concatenada) de <i>Cnemidophorus vacariensis</i> na distribuição total da espécie e nos grupos Rio Grande do Sul e Santa Catarina	25
Tabela 8. Caracteres merísticos e poros femurais dos indivíduos de <i>Cnemidophorus vacariensis</i> das nove localidades amostradas	30

RESUMO

O padrão filogeográfico do lagarto teídeo *Cnemidophorus vacariensis*, endêmico dos Campos de Cima da Serra do sul do Brasil, foi estudado com a análise de dois segmentos de DNA mitocondrial (12S e 16S) e caracteres morfológicos. Através de métodos de máxima parcimônia, máxima verossimilhança e bayesianos, ambos marcadores moleculares demonstraram, concordantemente, a presença de diferenciação genética entre os clados do Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC) e Paraná (PR). A existência de fluxo gênico foi registrada entre as linhagens do RS e SC, enquanto a população do PR está isolada das demais por, no mínimo, 300 quilômetros. Morfológicamente, a população proveniente do PR exibiu uma tendência de discriminação em três caracteres, enquanto os clados do RS e SC não apresentaram diferenças. Foi possível correlacionar, em parte, os resultados das análises molecular e morfológica, indicando concordância entre as duas abordagens. Os haplótipos exclusivos encontrados sugerem que as populações de *C. vacariensis* vivenciaram uma história evolutiva de isolamento, o que provavelmente ocorreu no Pleistoceno, quando pulsos de retração e expansão dos biomas abertos se alternavam, exibindo uma dinâmica que pode ter fragmentado por diversas vezes as regiões campestres que este lagarto habitava. Os principais distúrbios que os Campos de Cima da Serra enfrentam atualmente são as queimadas, a pecuária e a silvicultura de espécies exóticas, ameaças que tornam urgentes a definição de estratégias de conservação da região e sua biota. Os lagartinhos-pintados (*Cnemidophorus vacariensis*) ocorrem em afloramentos rochosos pouco extensos e se deslocam pouco, de modo que Unidades de Conservação de pequeno tamanho poderiam ser efetivas para a sua conservação. Porém, é importante considerar que cada linhagem evolutiva possui um potencial genético distinto das demais e todas devem ser conservadas.

Palavras-chave: *Cnemidophorus vacariensis*, filogeografia, DNA mitocondrial, Campos de Cima da Serra, conservação.

I. INTRODUÇÃO

I. 1. O gênero *Cnemidophorus* Wagler, 1830

A família Teiidae Gray, 1827 compreende dez gêneros e 105 espécies. Os indivíduos podem variar de poucos centímetros a mais de um metro de comprimento e estão amplamente distribuídos por toda a América. A grande maioria das espécies é diurna e habita os mais variados ambientes, desde desertos extremamente áridos até florestas tropicais (adaptado de POUGH *et al.*, 1998).

O gênero *Cnemidophorus* Wagler, 1830 abrigava cerca de 60 espécies distribuídas desde o norte dos Estados Unidos até o centro da Argentina e era subdividido em seis grupos (WRIGHT, 1993). Todas as espécies que ocorrem na América do Sul pertenciam ao grupo *lemniscatus*, sendo que os demais grupos (*deppii*, *cozumela*, *sexlineatus*, *tesselatus* e *tigris*) eram exclusivos das Américas do Norte e Central. REEDER *et al.* (2002), percebendo que o gênero *Cnemidophorus* não era monofilético, sugeriram que as espécies que ocorrem do norte dos Estados Unidos até o norte da Costa Rica fossem realocadas para o gênero *Aspidoscelis* Fitzinger, 1843. Dessa forma, o gênero *Cnemidophorus* passou a abrigar as espécies restritas à América do Sul e Antilhas Menores, porém continuou parafilético. Em estudo recente (GIUGLIANO, 2009) sobre as relações filogenéticas dos “cnemidophorinos” (grupo composto pelos gêneros *Cnemidophorus*, *Ameiva* Meyer, 1795, *Kentropyx* Spix, 1825 e *Aspidoscelis*), confirmou-se a parafilia de *Cnemidophorus* e, a fim de torná-lo monofilético, foi sugerida a realocação de *C. parecis* Colli, Costa, Garda, Kopp, Mesquita, Péres, Valdujo, Vieira & Wiederhecker, 2003 para o grupo que abriga as espécies de *Ameiva* que ocorrem no continente.

Atualmente, o gênero *Cnemidophorus* possui 23 espécies que podem ser divididas em quatro grupos conforme CEI (1993) e CABRERA (2004): *lacertoides*, *lemniscatus*, *longicaudus* e *ocellifer*. A espécie *Cnemidophorus vacariensis* Feltrim & Lema, 2000 pertence ao grupo *lacertoides* (FELTRIM & LEMA, 2000), juntamente com outras quatro espécies: *C. charrua* Cabrera & Carreira, 2009 (Cabo Polônio, Uruguai; CABRERA & CARREIRA, 2009), *C. lacertoides* Duméril & Bibron, 1839 (Argentina, Uruguai e sul do Brasil; PETERS & DONOSO-BARROS, 1970), *C. leachei* Peracca, 1897 (Província de Jujuy, Argentina; CEI & SCROCCHI, 1991) e *C. serranus* Cei & Martori, 1991 (serras de

Córdoba, Argentina; CEI & MARTORI, 1991). O holótipo e parátipos de *C. charrua* foram coletados em 1977 e 1972, respectivamente, e não se tem registro de coleta de outros exemplares há trinta anos (CABRERA & CARREIRA, 2009). Conforme os mesmo autores, a espécie está provavelmente extinta devido à pressão antrópica na região do Cabo Polônio (litoral do Departamento de Rocha, Uruguai), localidade-tipo e único lugar de registro de ocorrência de *C. charrua*.

Para o Brasil, são listadas dez espécies de *Cnemidophorus* (SBH, 2009): *C. abaetensis* Dias, Rocha & Vrcibradic, 2002, *C. cryptus* Cole & Dessauer, 1993, *C. lacertoides*, *C. lemniscatus* (Lineu, 1758), *C. littoralis* Rocha, Araújo, Vrcibradic & Costa, 2000, *C. mumbuca* Colli, Caldwell, Costa, Gainsbury, Garda, Mesquita, Filho, Soares, Silva, Valdujo, Vieira, Vitt, Werneck, Wiederhecker & Zatz 2003, *C. nativo* Rocha, Bergallo & Peccinini-Seale, 1997, *C. ocellifer* (Spix, 1825), *C. parecis* e *C. vacariensis*. Recentemente, uma nova espécie foi descrita na região nordeste do Cerrado, *C. jalapensis* Colli, Giugliano, Mesquita & França, 2009 (COLLI *et al.*, 2009), aumentando para onze o número de espécies de *Cnemidophorus* que ocorrem no Brasil.

Conforme WRIGHT (1993), os lagartos do gênero *Cnemidophorus* são pequenos (atingem cerca de 6-8 centímetros de comprimento rostro-cloacal), habitam áreas abertas, como campos e restingas e são ativos nas horas mais quentes do dia. Têm, em sua maioria, hábito alimentar insetívoro e apresentam comportamento de forrageio ativo; podem, no entanto, consumir presas que caracterizam dietas de predadores de espreita. Todas as espécies desse gênero são ovíparas, podendo apresentar reprodução cíclica ou contínua, dependendo das condições ambientais (WRIGHT, 1993).

I. 2. *Cnemidophorus vacariensis* Feltrim & Lema, 2000

O lagartinho-pintado (*Cnemidophorus vacariensis*) ocorre associado a afloramentos rochosos situados em áreas de campos em altitudes entre 900 a 1400 m. Sua distribuição conhecida é restrita a poucas localidades no no Estado do Paraná, no Município de Cândói (BÉRNILS *et al.*, 2004), no Estado de Santa Catarina, nos municípios de Capão Alto (GHIZONI *et al.*, 2009) e no Estado do Rio Grande do Sul, nos municípios de Vacaria, Bom Jesus (DI-BERNARDO *et al.*, 2003) e São Francisco de Paula (STAHNKE *et al.*, 2006) sendo, aparentemente, endêmico do Planalto das Araucárias no sul do Brasil.

A espécie é classificada como vulnerável na Lista da Fauna Ameaçada de Extinção do Rio Grande do Sul (MARQUES *et al.*, 2002) e do Paraná (MIKICH & BÉRNILS, 2004), e também na Lista Nacional da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (IBAMA, 2003). No Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (MARTINS & MOLINA, 2008), esta consta como ameaçada.

A principal ameaça para *C. vacariensis* é a utilização dos campos para atividades econômicas, como a pecuária e a silvicultura. A expansão crescente das monoculturas de pinus parece ser a ameaça mais séria à espécie, tendo em vista a drástica alteração estrutural resultante da conversão de áreas campestres em florestais (DI-BERNARDO *et al.*, 2003; BÉRNILS *et al.*, 2004). A prática de queimadas também contribui para a descaracterização dos habitats campestres onde a espécie ocorre (BÉRNILS *et al.*, 2004).

Os indivíduos de *C. vacariensis* (figura 1) têm hábito diurno (CARUCCIO, no prelo), ocorrem em áreas abertas com vegetação campestre dominante e capões de mata esparsos e estão intimamente associados aos afloramentos rochosos, onde fazem suas tocas e abrigam-se dos predadores (CARUCCIO, 2008). São tigmotérmicos, ou seja, utilizam as rochas como principal fonte de calor quando termorregulam (MACHADO, 2006) e alimentam-se preferencialmente de aranhas, gafanhotos, formigas e baratas, caracterizando-se como forrageadores ativos (SCHOSSLER, 2006).



Figura 1. Fêmea adulta de *Cnemidophorus vacariensis* procedente de Bom Jesus, RS. Exemplar não coletado. (Foto: Angelo Gomes)

Em *C. vacariensis*, o dimorfismo sexual está presente tanto no tamanho quanto na coloração do corpo (REZENDE-PINTO *et al.*, 2009). Segundo esses autores, as fêmeas apresentam maior comprimento rostro-cloacal do que os machos, destoando do padrão conhecido para os estudos com espécies da família Teiidae. A distância axila-virilha também é maior nas fêmeas, o que pode conferir vantagens reprodutivas, já que fêmeas maiores são capazes de produzir desovas com mais ovos ou ovos maiores. Os machos possuem cabeça, cauda e membros proporcionalmente maiores (em relação ao comprimento rostro-cloacal) do que as fêmeas, variáveis que podem apresentar relação com performances sociais. Quanto ao dimorfismo na pigmentação das escamas, os machos exibem as primeiras e segundas fileiras de escamas ventrais do abdômen coloridas de amarelo, padrão não observado em juvenis e fêmeas adultas.

I. 3. Os estudos filogeográficos

O genoma mitocondrial dos animais é pequeno e relativamente uniforme em tamanho entre vertebrados e invertebrados (BROWN *et al.*, 1979). Caracteriza-se como sendo haplóide e é formado por uma molécula de DNA dupla fita circular que varia entre 15.000 e 17.000 pares de bases de comprimento, estando presente em centenas e até milhares de cópias por célula (LI & GRAUR, 2000). O DNA mitocondrial é simples em estrutura e o único grande fragmento não codificante (de aproximadamente 1.000 pares de bases) é a região controladora (*CR – Control Region*) que apresenta função regulatória na dinâmica da molécula (BROWN, 1985). Essa região é de grande utilidade para análises filogenéticas, pois as taxas de substituição de bases encontram-se acentuadas em duas regiões da CR chamadas de segmentos hipervariáveis (*Hiper-Variable Segment*) HVS1 e HVS2, com uma região mais conservada com cerca de 200 pares de bases (VIGILANT *et al.*, 1989).

Em animais superiores, o DNA mitocondrial evolui muito mais rapidamente do que o DNA nuclear cópia única (BROWN *et al.*, 1979). As comparações entre as sequências de DNA de diferentes organismos revelam que a razão das substituições de nucleotídeos durante a evolução foi dez vezes maior em genomas mitocondriais do que em genomas nucleares, o que provavelmente é devido à reduzida fidelidade dos processos de replicação ou reparo – ou ambos – do DNA mitocondrial (ALBERTS *et al.*, 2002). As

comparações das sequências de DNA mitocondrial tem sido amplamente utilizadas em estudos de caráter evolutivo e filogenético, mostrando-se úteis para estimar as datas de eventos evolutivos relativamente recentes (ALBERTS *et al.*, 2002). Devido à sua rápida taxa de substituição de nucleotídeos, o DNA mitocondrial é adequado para o estudo de baixos níveis taxonômicos como relações intragenéricas ou intraespecíficas (BONVICINO & MOREIRA, 2001).

Embora os genes mitocondriais tenham diversas propriedades que os tornam adequados para análises aos níveis intragenérico e intraespecífico, eles não estão livres de dificuldades (*i.e.*, a árvore de um gene não reflete necessariamente a árvore da espécie) (PAMILO & NEI, 1988; NICHOLS, 2001). Apesar das suas limitações, a filogeografia fornece possíveis cenários históricos e geográficos nos quais os processos de especiação e diversificação ocorrem. Comprovando a relevância e aplicabilidade desta abordagem, AVISE (2000) afirma que aproximadamente 70% dos estudos filogeográficos foram realizados através de análises de DNA mitocondrial.

I. 4. A filogeografia e a conservação

A filogeografia é um campo de estudo relacionado com os princípios e processos que governam a distribuição geográfica das linhagens genealógicas, especialmente aquelas a nível intraespecífico (AVISE, 1998). Segundo BERMINGHAM & MORITZ (1998), ela foi introduzida como uma “ponte” unindo os estudos de processos micro e macroevolucionários; e procura testar a congruência entre as histórias evolutiva, demográfica e de distribuição dos táxons contra o particular cenário geológico e ecológico de uma região, além de determinar a cronologia da diversificação evolutiva. Estudos filogeográficos baseados em DNA mitocondrial tem sido realizados com sucesso devido à possibilidade de melhor descrever os padrões de distribuições geográficas, de relações filogenéticas e de distâncias genéticas entre linhagens animais, aumentando o conhecimento relativo à biogeografia e às áreas de endemismo (BERMINGHAM & MORITZ, 1998).

Uma aplicação prática da filogeografia reside em designar Unidades Evolutivamente Significativas (*Evolutionary Significant Units*, ESUs) e Unidades de Manejo (*Management Units*, MUs) com base nas relações filogenéticas encontradas entre e

dentro das populações estudadas. O propósito fundamental da definição de ESUs e MUs é assegurar que o patrimônio genético seja reconhecido e protegido e que o potencial evolutivo inerente de cada unidade seja mantido. Deste modo, o termo “significante” em ESU deveria ser visto como um reconhecimento de que o conjunto de populações está isolado historicamente e, assim, é provável que possua um potencial evolutivo distinto (MORITZ, 1994).

II. OBJETIVOS

Com o intuito de aprofundar os conhecimentos sobre a espécie *Cnemidophorus vacariensis* e acerca da problemática de sua conservação, propõe-se um estudo filogeográfico desta espécie empregando análises moleculares (baseadas em DNA mitocondrial) e morfológicas.

II. 1. Objetivos específicos

- Analisar, por meio da diferenciação molecular (DNA mitocondrial), a variabilidade genética entre e dentro das populações estudadas de *C. vacariensis*, caracterizar o fluxo gênico entre elas e verificar a existência de estruturação populacional.

- Realizar análises morfológicas de representantes das populações amostradas de *C. vacariensis* ao longo de sua área de ocorrência e compará-las com o objetivo de detectar possíveis diferenças existentes entre as populações.

- Inferir as relações filogeográficas entre as populações de *C. vacariensis* de forma a auxiliar os programas de conservação a determinar Unidades de Manejo.

III. JUSTIFICATIVA

As alterações resultantes de ações antrópicas sofridas pelos Campos de Cima da Serra no Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná nos últimos anos, além de modificarem a paisagem, tem reflexo direto sobre a fauna. Associando essas alterações antrópicas (ver item IV. 1. Área de estudo) ao pouco conhecimento atual sobre as características demográficas de *C. vacariensis*, torna-se de fundamental importância tanto o estudo da variabilidade e estrutura genéticas quanto dos padrões filogeográficos que caracterizam esta espécie.

Os estudos genéticos abrangem a determinação de diversos parâmetros, tais como diversidade genética, estrutura populacional e relações genéticas entre as populações geograficamente isoladas. Com a determinação das relações filogenéticas entre e dentro das populações, torna-se possível a designação de Unidades Evolutivamente Significativas e Unidades de Manejo (MORITZ, 1994).

Ainda que descrita recentemente (FELTRIM & LEMA, 2000), alguns aspectos da biologia e ecologia de *C. vacariensis* já foram esclarecidos (ver item I. 2.). Porém, existem em aberto questões referentes à sua total distribuição geográfica, relações entre as populações que se estendem ao longo do planalto sul-brasileiro, características das populações aparentemente isoladas, e relações filogenéticas intraespecíficas, as quais este projeto se propõe a averiguar.

Além disso, este estudo, juntamente com outros relacionados à fauna e flora locais, poderá fornecer aportes para um melhor conhecimento da dinâmica e ecologia das regiões de abrangência dos Campos de Cima da Serra e suas áreas de transição com a Mata com Araucária. À medida que os estudos preliminares forem executados, os resultados oferecerão ferramentas para avaliar os efeitos da fragmentação e degradação do habitat sobre a estrutura populacional e variabilidade genética da espécie. Dessa forma, será possível a geração de dados para a elaboração de planos de manejo e conservação de *C. vacariensis* e o seu ambiente.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

IV. 1. Área de estudo: Os Campos de Cima da Serra

Os Campos Sulinos foram assim nomeados por meio do estudo de prioridades para a conservação e o uso sustentável da biodiversidade da Mata Atlântica e dos Campos Sulinos do MMA/Pronabio. Este documento foi elaborado pela organização não-governamental Conservação Internacional (CI-Brasil), pelo Instituto Socioambiental (ISA), pelo Fundo Mundial para a Natureza (WWF) e pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). De maneira genérica, os campos da Região Sul do Brasil são denominados “pampas”. Essa denominação, no entanto, corresponde somente a um dos tipos de campo, mais encontrado ao sul do Estado do Rio Grande do Sul, atingindo também o Uruguai e a Argentina. Outro tipo, conhecido como Campos de Cima

da Serra, Campos de Altitude ou Planalto das Araucárias (figura 2), é encontrado em áreas de transição com o domínio de araucárias (*Araucaria angustifolia*), e nesta formação há ocorrência do lagarto *C. vacariensis*.



Figura 2. Campos de Cima da Serra – ambiente típico de ocorrência de *Cnemidophorus vacariensis*. Vacaria, RS.

O domínio morfoclimático das araucárias se estende desde o norte gaúcho, passando por Santa Catarina e Paraná, até o sul paulista e ocupa uma área de 400.000 km² (figura 3). A região das araucárias encontra-se no planalto meridional, onde a altitude pode variar de 500 metros até cerca de 1.200 metros. Em toda a sua extensão, o clima é subtropical com temperaturas amenas e a precipitação varia de 1.200 a 1.800 mm, sem grandes alterações durante o ano. O relevo apresenta desde ondulações suaves até bem acentuadas e o solo possui tendência a processos erosivos (AB’SÁBER, 1970).

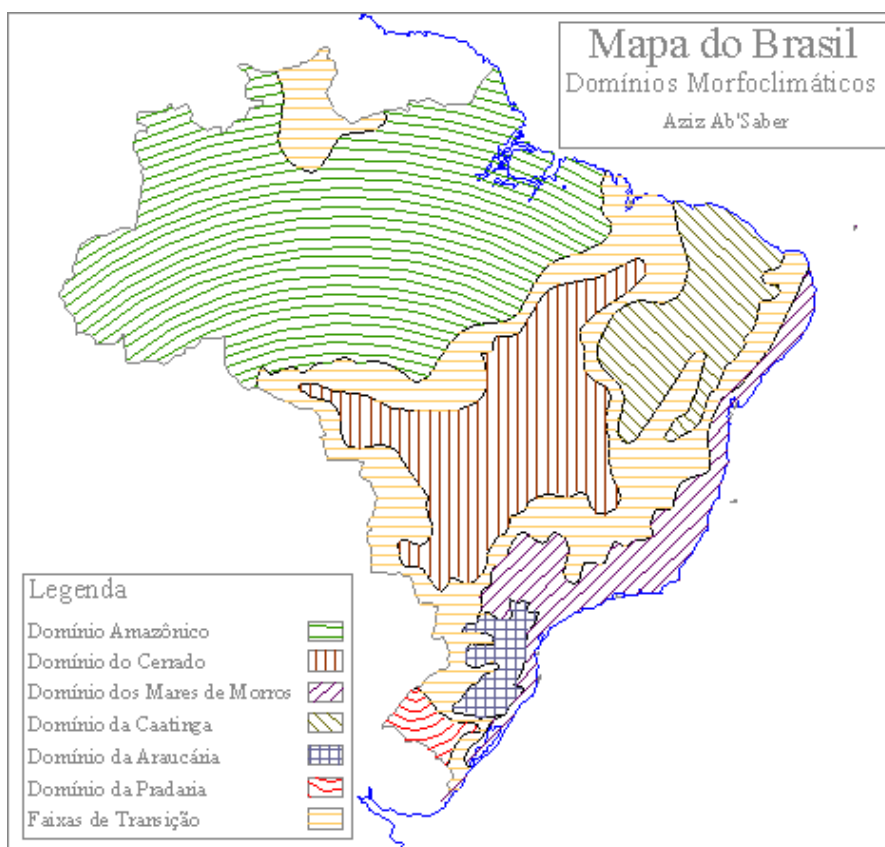


Figura 3. Mapa dos domínios morfoclimáticos brasileiros (AB'SÁBER, 1970).

As principais ameaças à vegetação remanescente da região do Planalto das Araucárias são a extração de madeira, a supressão da vegetação via queimadas, a substituição da cobertura florestal nativa por silvicultura de espécies exóticas, agricultura e alguma pressão urbana localizada (ZILLER & GALVÃO, 2001).

Segundo ZILLER & GALVÃO (2001), a expansão das monoculturas de árvores exóticas é um dos problemas mais graves no planalto. Com o avanço das plantações de árvores exóticas, especialmente *Pinus elliottii*, ocorre um isolamento cada vez maior dos fragmentos pequenos e médios de florestas nativas. Por sua alta capacidade invasora e maior velocidade de crescimento, essas monoculturas florestais acabam dificultando o avanço da Floresta Ombrófila Mista sobre o campo (tendência natural da sucessão ecológica) e/ou a reocupação de áreas outrora desmatadas. Outro problema dos plantios homogêneos é a ocupação dos espaços necessários à interligação dos fragmentos existentes. A conversão dos campos em outros tipos de uso vem transformando profundamente sua paisagem e colocando suas espécies sob ameaça de extinção. Além disso, as queimadas são

praticadas anualmente e estão entre os principais problemas que afetam os Campos Sulinos. Esse procedimento de manejo da terra conduz o sistema a um processo de seleção negativa, que elimina as plantas mais tenras e palatáveis ao gado bovino, favorecendo o aumento de populações de plantas mais resistentes, mais lenhosas e duras, destacando-se os caraguatás (*Eryngium* spp.). Outra prática ecologicamente nociva a esse ambiente é a sua conversão direta para o uso agrícola, processo que ocorre no Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

IV. 2. Coleta dos animais

Foram realizadas coletas ao longo do Planalto das Araucárias, desde o norte do Rio Grande do Sul até o sul do Paraná. Através do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade/SISBIO, parte do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente/IBAMA, foram concedidas as licenças 497-1, 973-1 e 16858-1.

Utilizando-se as localidades com ocorrência confirmada de *Cnemidophorus vacariensis* obtidas neste trabalho e na literatura, foi realizada a modelagem de nicho ecológico da espécie, com o objetivo de estabelecer áreas com potencial presença da espécie e melhor determinar as áreas de coleta. As análises foram feitas com a utilização do programa Maxent, que utiliza um algoritmo baseado no conceito de máxima entropia (PHILLIPS *et al.*, 2006), empregando dados de presença e pseudoausência. Os dados ambientais e climáticos utilizados foram obtidos no projeto Wordclim (www.bioclim.org), tendo sido incluídas nas análises 19 camadas bioclimáticas, somadas à altitude (todas com resolução de 30 s). As camadas utilizadas foram: BIO 01, Temperatura Média Anual; BIO 02, Média Diurna Mensal (temp. max - temp. min); BIO 03, Isotermalidade; BIO 04, Temperatura Sazonal; BIO 05, Temperatura Máxima do Mês mais Quente; BIO 06, Temperatura Mínima do Mês mais Frio; BIO 07, Variação Anual de Temperatura; BIO 08, Média de Temperatura do Trimestre mais úmido; BIO 09, Média de Temperatura do Trimestre mais seco; BIO 10, Média da Temperatura do Mês mais Quente; BIO 11; Média da Temperatura do Mês mais Frio; BIO 12, Precipitação Anual; BIO 13, Precipitação do Mês mais Úmido; BIO 14, Precipitação do Mês mais Seco; BIO 15, Precipitação Sazonal (Coeficiente de Variação); BIO 16, Precipitação do Trimestre mais Úmido; BIO 17, Precipitação do Trimestre mais Seco; BIO 18, Precipitação do Trimestre mais Quente; BIO

19, Precipitação do Trimestre mais Frio; ALT, Altitude (elevação Acima do Nível do Mar, em metros).

Com base nas áreas indicadas no mapa gerado, foram realizadas saídas de campo para a região do planalto nordeste do Rio Grande do Sul e sua continuidade no centro-sul catarinense, áreas de grande probabilidade de ocorrência da espécie. Para o centro-oeste catarinense e o sul do Paraná, regiões de menor probabilidade de ocorrência de *C. vacariensis*, também foi realizada saída de campo.

Os animais foram procurados no ambiente com o auxílio de ganchos específicos e coletados manualmente. Para cada lagarto coletado, foram registrados, em campo, o peso (balança com precisão de 0,1g), o sexo (quando possível) e a idade do animal (jovem ou adulto). *Cnemidophorus vacariensis* apresenta dimorfismo sexual (REZENDE-PINTO *et al.*, 2009): machos tem cabeças mais largas e exibem um padrão de coloração amarelo nas escamas ventrais laterais, ausente em jovens e fêmeas; fêmeas tem comprimento rostro-cloacal (CRC) e distância axila-virilha maiores. Foram considerados adultos os machos com CRC igual ou superior a 48,8 mm e as fêmeas com CRC igual ou superior a 57,4 mm (REZENDE-PINTO *et al.*, 2009).

Foram coletados 104 exemplares de *C. vacariensis* em nove pontos de coleta localizados em oito municípios (figura 4, tabela 1) ao longo da distribuição geográfica da espécie. Para cada ponto de captura, foram registradas as coordenadas geográficas com a utilização de GPS (*Global Positioning System*) obtidas em UTM (Projeção Universal Transversal de Mercator), *datum* SAD69.

Os exemplares coletados foram sacrificados em campo ou laboratório, com anestésico Citanest 3% e tiveram, logo depois, parte da cauda, coxa e/ou fígado extraídos e conservados em álcool absoluto (99,8%). Em seguida, foram fixados com formol 10%, conservados em álcool 70% e tombados na Coleção Científica do Laboratório de Herpetologia, Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) (anexo I). Os tecidos muscular e/ou hepático foram tombados na Coleção Científica de Tecidos do Laboratório de Herpetologia da mesma Universidade (UFRGST) (anexo I).

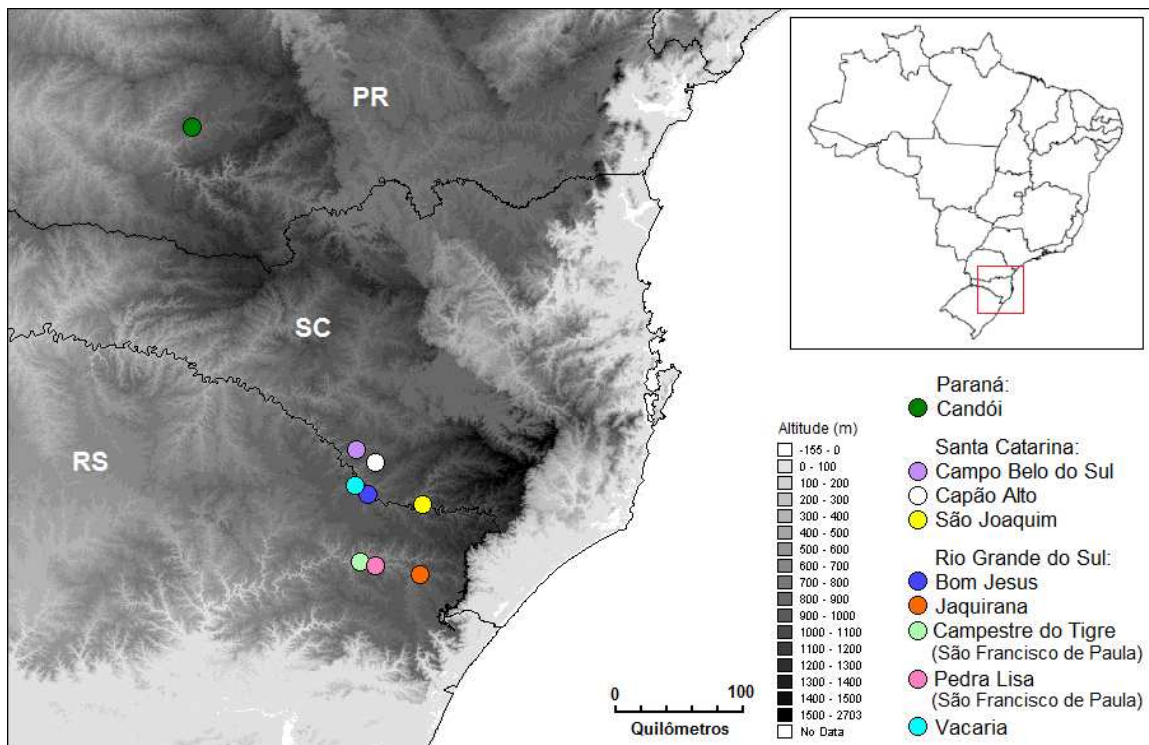


Figura 4. Localização geográfica dos pontos de coleta dos exemplares de *Cnemidophorus vacariensis* ao longo da sua área de ocorrência.

Tabela 1. Data, localidades, coordenadas geográficas dos pontos de coleta e número de tomo dos exemplares de *Cnemidophorus vacariensis* coletados (tamanho total da amostra = 104).

Local de coleta	Coordenadas geográficas	Data da coleta	Tamanho da amostra	Nº Coleção (UFRGS)
Bom Jesus/RS	0528280/6868569	29-30/04/2007	07	4561 a 4567
Bom Jesus/RS	0527300/6868202	13/01/2008	06	4780 a 4785
Bom Jesus/RS	0527444/6161889	03/08/2008	15	4881 a 4895
Vacaria/RS	0522930/6871706	11/04/2008	06	4720 a 4725
Campestre do Tigre/RS*	0525689/6809079	07/06/2008	07	4809 a 4815
Pedra Lisa/RS*	0537349/6805455	08/06/2008	08	4816 a 4823
Jaquirana/RS	0568934/6798503	06/09/2008	02	4919 e 4920
Jaquirana/RS	0568934/6798503	15/05/2009	05	5271 a 5275
Campo Belo do Sul/SC	0523991/6901133	15/07/2008	16	4860 a 4875
Capão Alto/SC	0537123/6890063	16/07/2008	16	4839 a 4854
São Joaquim/SC	0571890/6855879	09/04/2009	07	5196 a 5202
Candói/PR	0401723/7164711	09/01/2009	09	5074 a 5101

Legenda: PR, Paraná; RS, Rio Grande do Sul; SC, Santa Catarina. *Campestre do Tigre e Pedra Lisa são localidades da Vila Rural de Cazuza Ferreira, pertencente ao Município de São Francisco de Paula/RS.

IV. 3. Análises Moleculares

Extração de DNA

A extração de DNA das amostras coletadas foi feita utilizando-se um protocolo de fenol-clorofórmio modificado, baseado em SAMBROOK *et al.* (1989), para extração de DNA de células vermelhas do sangue. Este mesmo protocolo pode ser utilizado para extração de material genético de tecido muscular e hepático, o que foi feito a partir da cauda, coxa e/ou fígado de *C. vacariensis* (anexo II).

Verificação da qualidade do material genético extraído

Antes da amplificação do material genético, as extrações foram avaliadas em relação à quantidade e qualidade do DNA extraído. O material extraído foi aplicado em gel de agarose 1% juntamente com marcadores de peso molecular LowMass DNA Ladder, (Invitrogen®), que permitiram posterior comparação da migração e da intensidade das bandas.

Reação de amplificação

A diversidade genética mitocondrial foi estudada através do sequenciamento de parte dos genes mitocondriais ribossomais 12S (\pm 350 pb) e 16S (\pm 450 pb) de 65 e 72 indivíduos de *C. vacariensis*, respectivamente. Foram utilizados os iniciadores 12Sa, 12Sb, 16SaR e 16Sd usados por REEDER (1995) nas condições citadas no anexo III. Inicialmente, a variabilidade molecular de um terceiro segmento (citocromo *b*, \pm 350 pb) foi avaliada para 35 indivíduos de *C. vacariensis*, porém, por apresentar as mesmas relações filogenéticas que os fragmentos 12S e 16S recuperavam entre os clados e devido a problemas de amplificação, o citocromo *b* foi retirado da análise final.

As reações de amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foram realizadas no termociclador MJ Research PTC-200, com volume total de 20 μ L, composto por aproximadamente 30 ng de DNA, 0,2 μ M de tampão de PCR 10X, 0,2 μ M de cada iniciador, 0,2 μ M de cada dNTP, 0,6 mM de MgCl₂, 1 U de Taq Platinum (Invitrogen®) e H₂O Mili-q para completar o volume. As amplificações foram conferidas em gel de agarose 1% e estas foram consideradas bem sucedidas quando o produto se encontrava em uma concentração superior a 60 ng/ μ L. Os produtos foram purificados com acetato de amônio

para posterior seqüenciamento no MegaBACE 1000 DNA Sequencer (GE Healthcare®) (anexo III).

Os fragmentos amplificados foram seqüenciados nos dois sentidos (senso e anti-senso). A confirmação da qualidade das seqüências foi realizada manualmente no programa Chromas Lite 2.01 (TECHNELYSIUM PTY LTD., 2005) e, quando possível, foi gerada a fita consenso com os programas Phred (GREEN & EWING, 2002) e Phrap (GREEN, 1999). O alinhamento das seqüências foi realizado com o programa Clustal W (HIGGINS *et al.*, 1994) através da interface do programa Mega 4 (TAMURA *et al.*, 2007).

Grupo externo

Em estudo recente, GIUGLIANO (2009) analisou as relações filogenéticas dentro do gênero *Cnemidophorus*. Para a análise do complexo *lacertoides*, não foi possível conseguir amostra de *C. leachei* e essa espécie não foi incluída na filogenia do grupo. Assim, *C. vacariensis* foi posicionada como a espécie irmã das outras duas espécies analisadas, da seguinte maneira: ((*C. lacertoides*, *C. serranus*) *C. vacariensis*). Por apresentar maior proximidade geográfica com a espécie deste estudo, *C. lacertoides* foi escolhida e utilizada neste trabalho como grupo externo nas análises moleculares. As seqüências dos genes 12S e 16S de *C. lacertoides* foram publicadas por REEDER *et al.* (2002) e acessadas através do GenBank (12S: acesso nº AY046437; 16S: acesso nº AY046479).

Análises de diversidade molecular e testes de neutralidade

Sessenta e cinco e 72 indivíduos de *C. vacariensis* foram seqüenciados e analisados para os genes 12S e 16S, respectivamente (tabela 2; anexo IV). Quando os dados das duas seqüências foram tratados juntos (concatenados), esse número passou para 58 indivíduos (tabela 2; anexo IV). Os exemplares coletados foram agrupados por localidade de forma a usar a procedência para definir populações geográficas.

Tabela 2. Número de exemplares de *Cnemidophorus vacariensis*, por procedência, usados nas análises genéticas.

<i>Local de coleta</i>	<i>12S</i>	<i>16S</i>	<i>12S + 16S</i>
Bom Jesus/RS	18	21	18
Vacaria/RS	4	6	4
Campestre do Tigre/RS	7	6	6
Pedra Lisa/RS	4	5	4
Jaquirana/RS	3	4	3
Campo Belo do Sul/SC	11	14	10
São Joaquim/SC	4	5	4
Capão Alto/SC	11	9	8
Candói/PR	3	2	1
	65	72	58

Legenda: RS, Rio Grande do Sul; SC, Santa Catarina; PR, Paraná. Campestre do Tigre e Pedra Lisa são localidade de São Francisco de Paula/RS.

Os índices de polimorfismos das seqüências, tais como número de sítios segregantes, número de transições e transversões e os testes de neutralidade das seqüências (D de Tajima [TAJIMA, 1989] e Fs de Fu [FU, 1997]), para os dados separados e concatenados, foram realizados no programa Arlequin 3.11 (EXCOFFIER *et al.*, 2005). Quanto aos grupos populacionais, os dados foram abordados de duas formas: (1) com todas as amostras reunidas em um único grupo e (2) com as amostras separadas em dois grupos (grupo Rio Grande do Sul e grupo Santa Catarina). Candói/PR constituiria um terceiro grupo, mas não entrou nas análises realizadas com os grupos separados por estar representado apenas por um indivíduo para os segmentos concatenados. Os gráficos da distribuição dos *mismatches* (ROGERS & HARPENDING, 1992) foram gerados no programa DnaSP 4.10 (ROZAS *et al.*, 2003) com os dados concatenados e usando duas abordagens: (1) com toda a amostra sendo tratada como uma única população e (2) com os dois maiores clados (clados 2 e 3; ver Resultados: figuras 7 e 8) analisados em separado.

Análises de estruturação populacional

Após a realização de testes exploratórios e verificação de que os dois segmentos mitocondriais (12S e 16S) recuperaram as mesmas relações filogenéticas entre as populações amostradas, decidiu-se por realizar as análises seguintes com os dados concatenados.

Para avaliar a estruturação populacional, foi realizada uma AMOVA (Análise de Variância Molecular) (EXCOFFIER *et al.*, 1992) usando o método de distância par-a-par com três dos quatro grupos formados: (1) as três populações de Santa Catarina, (2) três populações do Rio Grande do Sul (Vacaria, Bom Jesus e Campestre do Tigre) e (3) duas populações do Rio Grande do Sul (Pedra Lisa e Jaquirana). A população procedente do Paraná foi excluída da análise por estar representada por apenas um indivíduo e, assim, não se adequar ao teste. O nível de distância genética entre os pontos amostrais foi averiguado através de uma análise de estruturação par-a-par com o índice F_{ST} (WRIGHT, 1921) e conduzida no programa Arlequin 3.11 (EXCOFFIER *et al.*, 2005). A rede de distância, calculada com o algoritmo *Median Joining* (BANDELT *et al.*, 1999) no programa Network 4.5.1.6 (FLUXUS TECHNOLOGY LTD., 2009), foi criada para representar a mais provável relação entre os haplótipos.

Análises filogenéticas

Três abordagens de análise filogenética foram utilizadas: máxima verossimilhança (ML), usando o programa Garli 0.96b (ZWICKL, 2006), máxima parcimônia (MP), usando o programa NONA (GOLOBOFF, 1999) com a interface WinClada 1.0 (NIXON, 2002) e métodos bayesianos (BI) usando o programa MrBayes v.3.2 (RONQUIST & HUELSENBECK, 2003). Com fins de otimizar a realização das análises, um único representante de cada haplótipo foi mantido e os haplótipos repetidos foram eliminados (tabela 3). Assim, a árvore final apresenta menos indivíduos do que o total amostrado, mas possui todos os haplótipos encontrados.

Tabela 3. Indivíduos de *Cnemidophorus vacariensis* representantes de cada haplótipo encontrado e exemplares retirados das análises filogenéticas, com sua procedência.

<i>Indivíduo representante do haplótipo*</i>	<i>Exemplares de mesmo haplótipo retirados das análises*</i>
Bom Jesus (Vac01_BJ_RS)	Campestre do Tigre (Vac140_SF_CT_RS)
Bom Jesus (Vac02_BJ_RS)	Bom Jesus (Vac05_BJ_RS)
Bom Jesus (Vac03_BJ_RS)	Bom Jesus (Vac125_BJ_RS) Campestre do Tigre (Cvac139_SF_CT_RS)
Bom Jesus (Vac04_BJ_RS)	Vacaria (Vac127_VAC_RS, Vac131_VAC_RS) Campestre do Tigre (Cvac144_SF_CT_RS)
Bom Jesus (Cva06_BJ_RS)	Bom Jesus (Cvac128_BJ_RS, Cvac133_BJ_RS) Vacaria (Vac134_VAC_RS) Campestre do Tigre (Cvac143_SF_CT_RS) Campo Belo do Sul (Cvac154_CBS_SC)
Bom Jesus (Vac189_BJ_RS)	Bom Jesus (Cvac190_BJ_RS)
Campestre do Tigre (Vac145_SF_CT_RS)	Campo Belo do Sul (Vac155_CBS_SC, Vac156_CBS_SC, Cvac164_CBS_SC)
Pedra Lisa (Vac152_SF_PL_RS)	Pedra Lisa (Cvac150_SF_PL_RS, Vac153_SF_PL_RS)
Jaquirana (Cvac1126_JAQ_RS)	Jaquirana (Cvac313_JAQ_RS, Cvac314_JAQ_RS)
Campo Belo do Sul (Cvac162_CBS_SC)	Campo Belo do Sul (Cvac170_CBS_SC) Capão Alto (Cvac182_CA_SC)
Capão Alto (Vac172_CA_SC)	Capão Alto (Vac173_CA_SC, Vac174_CA_SC, Vac179_CA_SC, Vac180_CA_SC, Cvac184_CA_SC) São Joaquim (Cvac816_SJO_SC, Cvac817_SJO_SC, Cvac820_SJO_SC, Cvac822_SJO_SC)

Legenda: *entre parênteses, os códigos relativos à nomenclatura utilizada na árvore filogenética. BJ, Bom Jesus; CA, Capão Alto; CBS, Campo Belo do Sul; CT, Campestre do Tigre; JAQ, Jaquirana; PL, Pedra Lisa; RS, Rio Grande do Sul; SC, Santa Catarina; SF, São Francisco de Paula; SJO, São Joaquim.

Para análise de MP, foi utilizado o algoritmo de busca heurística *tree bisection-reconnection* (TBR), com 1.000 réplicas (mult*N), retendo três árvores por réplica (hold/3) e podendo reter até 10.000 árvores. As árvores igualmente parcimoniosas foram submetidas a um consenso estrito. O suporte de cada clado resultante das análises por MP foi determinado, conforme FELSENSTEIN (1985), por *bootstrap* (1.000 réplicas, 100 mult*N, hold/10).

Para análise de ML, o modelo de evolução TIM3+G foi o mais apropriado para os segmentos mitocondriais concatenados conforme inferência do programa jModelTest 0.1.1

(POSADA, 2008) através do critério de informação de Akaike (AIC) (AKAIKE, 1974). Foram realizadas quatro buscas usando os parâmetros padrão do programa e o suporte dos ramos foi determinado com 500 réplicas de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985).

Para a análise BI, foi utilizado o modelo de evolução GTR+I+G, que é mais complexo do que o inferido (TPM3uf+G) pelo programa jModelTest 0.1.1 (POSADA, 2008) através do critério de informação bayesiano de Schwarz (BIC) (SCHWARTZ, 1978) porque permite a entrada de seis taxas de frequência de mutação de bases nucleotídicas em vez de três. A utilização de um modelo mais complexo do que o apontado pelo programa se justifica pela inexistência deste modelo dentro dos disponíveis para uso no programa MrBayes 3.2, e pela evidência de que o uso de um modelo com excesso de parâmetros na análise Bayesiana não afeta negativamente a inferência (HUELSENBECK & RANNALA, 2004). A análise Bayesiana iniciou gerando árvores aleatórias e prosseguiu por 20×10^6 gerações. As árvores foram amostradas a cada 1.000 gerações, produzindo um total de 20.000 árvores. Duas corridas independentes foram conduzidas, e as primeiras 2.000 árvores foram descartadas como *burn-in*.

IV. 4. Análises Morfológicas

Um total de 89 exemplares de *C. vacariensis* foram comparados com relação a 25 parâmetros de contagem de escamas. As variáveis tomadas são usualmente utilizadas para discriminar espécies dentro do gênero *Cnemidophorus* (AVILLA-PIRES, 1995; CABRERA & CARREIRA, 2009; COLLI *et al.*, 2003) e dentro de outros gêneros da família Teiidae (AVILLA-PIRES, 1995; TAYLOR *et al.*, 2005; WERNECK *et al.*, 2009), com algumas adaptações desenvolvidas durante o planejamento deste projeto. Para os parâmetros pares, as contagens foram tomadas do lado direito do corpo do animal. A seguir, são listadas as contagens realizadas: (1) escamas dorsais granulares longitudinais (contadas na altura da 15ª escama ventral), (2) escamas dorsais granulares transversais, (3) escudos ventrais longitudinais, (4) escudos ventrais transversais, (5) escudos parietais e interparietal, (6) escamas supraoculares, (7) escamas supraciliares, (8) escamas supralabiais pequenas, (9) escamas supralabiais grandes, (10) escamas infralabiais pequenas, (11) escamas infralabiais grandes, (12) soma das pós-mentais (escamas maiores do mento) nas duas fileiras, (13) escamas gulares granulares em uma linha ao longo do mento, (14)

escamas gulares granulares margeando as pós-metais, (15) filas de escamas mesoptiquiais (escamas maiores entre as gulares do mento e as placas ventrais), (16) escamas pré-femurais, (17) escamas infratibiais, (18) escamas pré-cloacais pequenas, (19) escamas pré-cloacais grandes, (20) escamas ao redor da cauda (contadas na 5ª fileira após a cloaca), (21) escamas subcaudais (contadas somente para os exemplares com cauda íntegra), (22) soma de todas as escamas, inclusive occipitais, em contato com o perímetro externo das escamas parietais e interparietal, (23) lamelas subdigitais no 4º artelho do membro posterior direito, (24) lamelas subdigitais no 4º artelho do membro anterior direito. Além desses parâmetros, também foram contados os (25) números de poros femurais na coxa esquerda. Não há diferença entre o número de poros femurais das coxas direita e esquerda, para um mesmo indivíduo (REZENDE-PINTO *et al.*, 2009).

Análises estatísticas

Os dados morfológicos foram tratados, inicialmente, através de duas análises canônicas: (1) Análise de Redundância e (2) Análise dos Componentes Principais. Com a Análise de Redundância (RDA), buscou-se discriminar quais as variáveis que mais contribuem para a variância das amostras estudadas, e que percentagem desta variância é explicada pelas variáveis ambientais (TER BRAAK, 1988), representadas neste estudo pela procedência dos animais. Com a Análise dos Componentes Principais (PCA), também se procurou determinar quais as variáveis que mais contribuem para a variância das populações amostradas, porém a composição dos grupos separados *a priori* (neste caso, a procedência dos indivíduos) não é levada em consideração pelo teste.

A RDA foi realizada no programa Canoco 4.5 (TER BRAAK & SMILAUER, 2002) e o resultado foi visualizado no programa CanoDraw (TER BRAAK & SMILAUER, 2002). O diagrama gerado pela RDA apresenta cada variável (neste estudo, as variáveis morfológicas e os locais de procedência dos animais) como um vetor plotado sobre os dois principais eixos de ordenação, onde o comprimento do vetor é proporcional à sua importância e o ângulo entre o vetor e cada eixo de ordenação representa o seu grau de correlação com o eixo.

Os dados a serem analisados em uma RDA devem ser organizados em matrizes e estas não podem conter dados faltantes. Assim, a variável *escamas subcaudais* foi removida

do teste porque continha 42 indivíduos com dados faltantes, já que essa contagem é feita apenas para os exemplares com cauda íntegra (inteira e não-regenerada).

Foi feita uma RDA inicial, controlando a variável (sexo + idade) e retirando 15 exemplares que não puderam ser sexados devido ao seu comprimento rostro-cloacal muito pequeno. Essa análise mostrou que apenas 6% da variação morfológica é explicada pela variável (sexo + idade). Assim, decidiu-se retirar essas variáveis do teste e refazê-lo adicionando os 15 exemplares não-sexados.

A PCA foi realizada no programa Past 1.97 (HAMMER *et al.*, 2001). Para os dois primeiros componentes da PCA, duas variáveis (escamas dorsais transversais e escamas dorsais longitudinais) destacaram-se por mais influenciar a distribuição das amostras no diagrama. No programa SigmaStat 3.5 (JANDEL CORP., 2006), testes-t foram realizados para verificar a presença de dimorfismo sexual em *C. vacariensis* para essas duas contagens e, assim, validar as comparações feitas com os indivíduos de ambos os sexos juntos. Com o objetivo de testar se as variações existentes para essas contagens podem ser correlacionadas com os locais de procedência dos indivíduos, foram construídos, no Excel, gráficos de dispersão para machos, fêmeas e ambos. Essa abordagem visou identificar a existência de possíveis diagnoses que permitissem diferenciar com segurança as populações.

V. RESULTADOS

V. 1. Coleta dos animais: Modelagem de nicho ecológico

A modelagem de nicho ecológico efetuada no presente trabalho (AUC = 0,992; figura 5) sugere que a presença de *C. vacariensis* realmente se limita aos Campos de Cima da Serra, no sul do Brasil. O limite norte da distribuição da espécie, inferido pelo programa, é a região sul do Paraná, onde há registro confirmado para Candói. O mapa gerado sugere altas probabilidades de ocorrência de *C. vacariensis* nas regiões dos campos de altitude gaúcho e catarinense e baixas possibilidades de ocorrência da espécie no centro-oeste catarinense e sul do Paraná. A tabela 4 apresenta a importância de cada uma das variáveis utilizadas nos resultados obtidos.

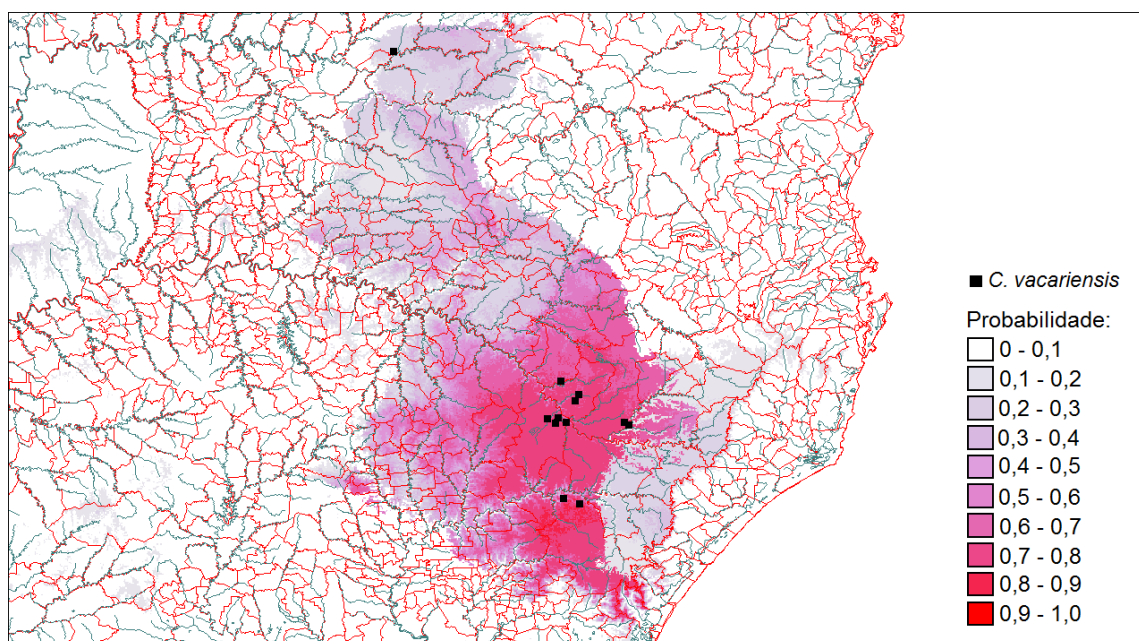


Figura 5. Mapa de modelagem de nicho ecológico para *Cnemidophorus vacariensis* com sua probabilidade de ocorrência. (■) Locais com registro confirmado para a espécie.

Tabela 4. Variáveis consideradas e percentual de contribuição de cada uma delas na modelagem de nicho ecológico de *Cnemidophorus vacariensis*.

Variável	Contribuição (%)
BIO 14 – Precipitação do mês mais seco	37,8
ALT – Altitude	25,3
BIO 08 – Média de temperatura do trimestre mais úmido	15,8
BIO 05 – Temperatura máxima do mês mais quente	6,9
BIO 04 – Temperatura sazonal	3,9
BIO 02 – Média diurna (temp. max – temp. min.)	3,5
BIO 15 – Precipitação sazonal (coeficiente de variação)	2,1
BIO 03 – Isotermalidade	1,2
BIO 10 – Média da temperatura do mês mais quente	1
BIO 09 – Média da temperatura do trimestre mais seco	1
BIO 01 – Temperatura média anual	0,5
BIO 06 – Temperatura mínima do mês mais frio	0,4
BIO 07 – Variação anual de temperatura	0,3
BIO 19 – Precipitação do trimestre mais frio	0,2
BIO 11 – Média da temperatura do mês mais frio	0,1
BIO 12 – Precipitação anual	0
BIO 17 – Precipitação do trimestre mais seco	0
BIO 13 – Precipitação do mês mais úmido	0
BIO 18 – Precipitação do trimestre mais quente	0
BIO 16 – Precipitação do trimestre mais úmido	0

V. 2. Análises Moleculares

Análises de diversidade molecular

Após edição e alinhamento das sequências dos genes 12S e 16S, fragmentos de 326 e 466 pares de bases (pb) foram analisados para 65 e 72 indivíduos de *C. vacariensis*, respectivamente. Para os dados concatenados, foram obtidos no total 792 pb, sendo 43 locos polimórficos: entre as mutações, 40,48% eram transições, 35,71% eram transversões e 23,81% eram *indels* (eventos de inserção/deleção). Para a espécie como um todo, o índice de diversidade genética (haplotípica) foi de $0,9449 \pm 0,0173$. Quando analisados em separado, os grupos do Rio Grande do Sul e Santa Catarina apresentaram índices de diversidade haplotípica semelhantes.

Análises de estruturação populacional

A rede de haplótipos apresentou quatro clados com correspondência geográfica bem definida (figura 6). No Paraná, a localidade representada pelo clado 1 (composto por um indivíduo) está distante 300 quilômetros da população mais próxima (Campo Belo do Sul, SC) e exibe um haplótipo exclusivo. O clado 2 é composto por indivíduos das três localidades catarinenses amostradas (São Joaquim, Capão Alto e Campo Belo do Sul), que estão separadas das localidades gaúchas pelo Rio Pelotas. Os indivíduos coletados em Capão Alto compartilham haplótipos com aqueles procedentes de São Joaquim e Campo Belo do Sul, além de apresentarem dois haplótipos exclusivos. Em Campo Belo do Sul, os exemplares analisados apresentam sete haplótipos, dos quais dois estão relacionados ao clado 2 e cinco, ao clado 3 (dois exclusivos e três compartilhados com outras localidades gaúchas), indicando uma possível presença de fluxo gênico. No Rio Grande do Sul, os exemplares provenientes de Vacaria, Bom Jesus e Campestre do Tigre compartilham os haplótipos mais frequentes do clado 3, enquanto o clado 4 está isolado das demais localidades presentes no clado 3 pelo Arroio São Tomé (afluente do Rio das Antas). Quando comparadas ao clado 3, Pedra Lisa, mais próxima geograficamente (11 quilômetros) de Campestre do Tigre, apresenta haplótipos mais distantes do que Jaquirana, afastada 43 quilômetros de Campestre do Tigre (figura 6). O grupo externo, representado por um indivíduo de *Cnemidophorus lacertoides*, está distante 32 passos mutacionais de Candói, PR (clado 1), 25 passos mutacionais do clado 2 e 26-25 mutações dos clados 3 e 4, respectivamente (figura 6).

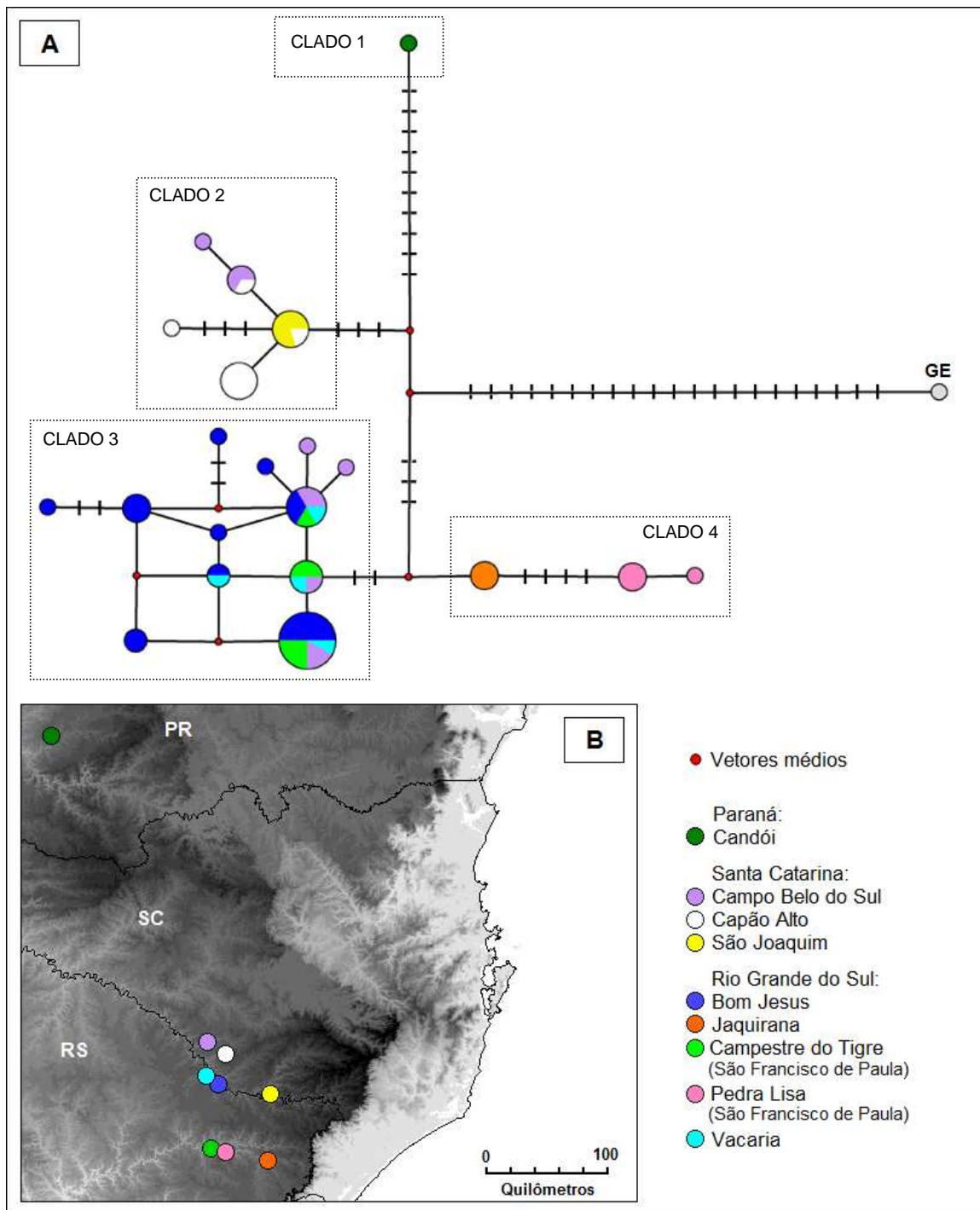


Figura 6. (A) Rede de haplótipos dos genes 12S e 16S concatenados para 58 indivíduos de *Cnemidophorus vacariensis* e grupo externo (*C. lacertoides*, GE). O tamanho dos círculos indica a frequência dos haplótipos. Vetores médios representam haplótipos extintos ou não amostrados. Uma mutação não é mostrada, duas mutações são representadas por dois traços. (B) Mapa mostrando as localidades de coleta.

A AMOVA foi estatisticamente significativa para as três comparações e indicou que 44,74% da variação total da amostra foi devido à divisão entre os clados 2, 3 e 4; 24,45% da variação estava distribuída entre as populações dentro dos três grupos; e o restante (30,82%) deveu-se à variação amostral (tabela 5).

Tabela 5. Resultados da AMOVA para *Cnemidophorus vacariensis*.

<i>Fonte da variação</i>	<i>GL</i>	<i>%</i>	<i>Estatística ϕ</i>
Entre grupos	2	44,74	ϕ_{ct} : 0,44735, $p = 0,012 \pm 0,003$
Entre populações dentro dos grupos	6	24,45	ϕ_{sc} : 0,44238, $p < 0,000$
Entre populações	49	30,82	ϕ_{st} : 0,69183, $p < 0,000$

Legenda: três grupos (clados 2, 3 e 4); GL, graus de liberdade; %, porcentagem da variação.

A divergência entre os locais amostrados, medida com comparações par-a-par dos valores de F_{ST} , foi significativa para 21 das 36 comparações realizadas (tabela 6). Usando o critério sugerido por WRIGHT (1978), Vacaria mostrou pouca diferença ($<0,05$) em relação a Bom Jesus e Campestre do Tigre; mas Campestre do Tigre e Bom Jesus exibiram divergência moderada (0,077), de modo que considerar os exemplares coletados nessas três localidades como uma única população é uma inferência que deve ser feita com ressalvas. Ainda entre as localidades gaúchas, as maiores diferenças ocorreram quando Pedra Lisa e Jaquirana estiveram envolvidas nas comparações. Entre as localidades catarinenses, São Joaquim e Capão Alto mostraram diferença alta entre si enquanto Campo Belo do Sul mostrou diferença muito alta ($>0,49$) tanto de Capão Alto como de São Joaquim. A diferenciação genética de Candói em relação às outras localidades foi sempre muito alta ($>0,6$) já que o exemplar proveniente dessa localidade difere dos demais por muitos passos mutacionais (de 13 a mais de 20). Conforme o critério de WRIGHT (1978), as comparações entre localidades de clados distintos mostraram divergência muito grande ($>0,79$) com exceção daquelas em que Campo Belo do Sul estava envolvida, já que essa localidade apresenta indivíduos que pertencem tanto ao clado 2 como ao clado 3.

Tabela 6. Comparações par-a-par dos valores de F_{ST} obtidos a partir da distância entre os haplótipos dos genes 12S e 16S concatenados entre as populações amostradas de *Cnemidophorus vacariensis*.

	Rio Grande do Sul					Santa Catarina			Paraná
	BJ <i>n</i> = 18	CT <i>n</i> = 6	JAQ <i>n</i> = 3	PL <i>n</i> = 4	VAC <i>n</i> = 4	SJO <i>n</i> = 4	CA <i>n</i> = 8	CBS <i>n</i> = 10	CAN <i>n</i> = 1
BJ	-								
CT	0,077	-							
JAQ	0,547	0,824	-						
PL	0,711	0,889	0,930	-					
VAC	-0,029	-0,067	0,707	0,839	-				
SJO	0,801	0,946	1	0,982	0,91	-			
CA	0,799	0,885	0,885	0,908	0,856	0,190	-		
CBS	0,223	0,16	0,305	0,561	0,081	0,496	0,544	-	
CAN	0,832	0,944	1	0,974	0,882	1	0,898	0,626	-

Legenda: em negrito, as comparações com $P < 0,05$. N, tamanho da amostra; BJ, Bom Jesus; VAC, Vacaria; CT, Campestre do Tigre; PL, Pedra Lisa; JAQ, Jaquirana; CBS, Campo Belo do Sul; CA, Capão Alto; SJO, São Joaquim, CAN, Candói.

Testes de neutralidade

Os testes de neutralidade, calculados tanto para a distribuição total como para os grupos de Santa Catarina e Rio Grande do Sul não indicaram qualquer sinal de que as seqüências tenham evoluído sobre pressões seletivas. A tabela 7 apresenta os resultados das análises de diversidade para todas as amostras coletadas e também para os dados separados em dois grupos (Rio Grande do Sul e Santa Catarina).

Tabela 7. Resultados das análises de diversidade para os genes 12S e 16S (individuais e de forma concatenada) de *Cnemidophorus vacariensis* na distribuição total da espécie (T) e nos grupos Rio Grande do Sul (RS) e Santa Catarina (SC).

	<i>N</i>	<i>LV</i>	<i>h</i>	<i>Hd</i>	π
12S (T)	65	14	07	0,7385 ± 0,0341	0,010157 ± 0,005862
16S (T)	72	29	25	0,9245 ± 0,0161	0,008675 ± 0,004856
12S + 16S (T)	58	42	29	0,9449 ± 0,0173	0,009021 ± 0,004761
12S + 16S (RS)	35	19	15	0,8958 ± 0,0367	0,004957 ± 0,002831
12S + 16S (SC)	22	16	10	0,8918 ± 0,0395	0,007074 ± 0,003941

N, número de seqüências; LV, número de locos variáveis; h, número de haplótipos; Hd, diversidade haplotípica; π , diversidade nucleotídica.

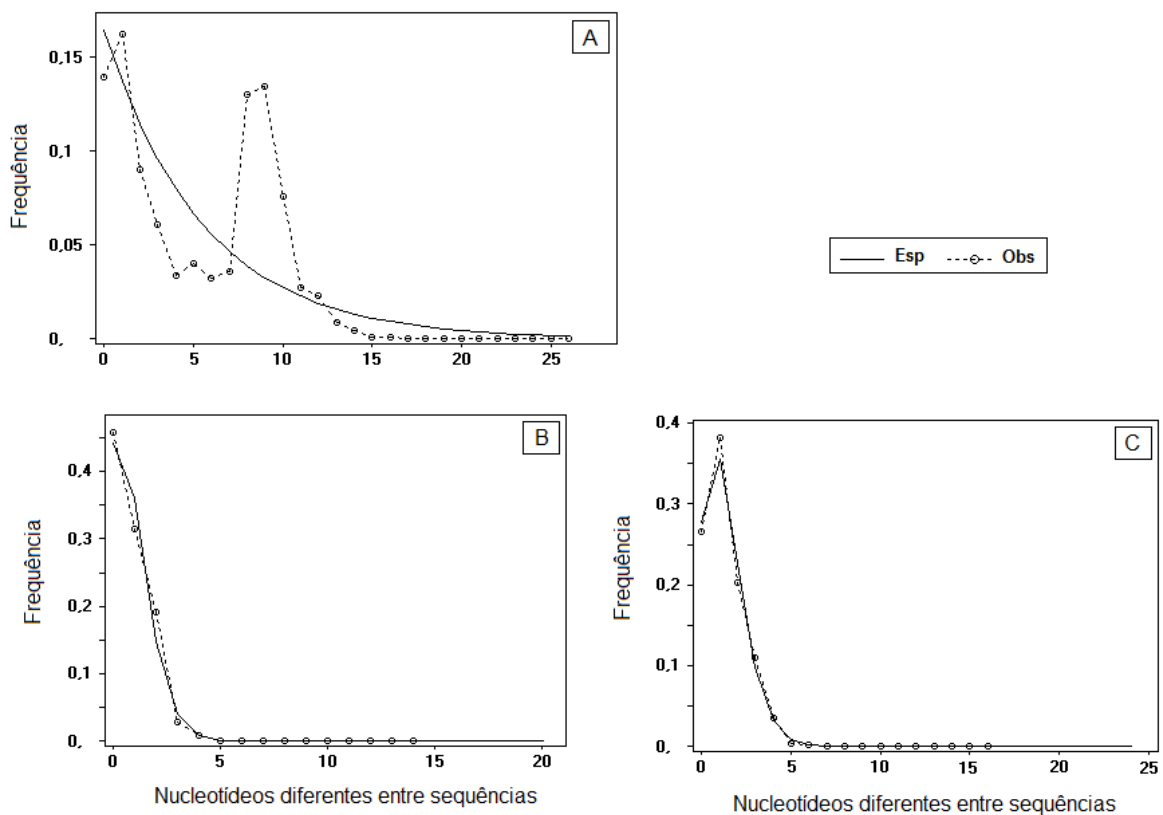


Figura 7. Gráficos da distribuição dos *mismatches* para os genes 12S e 16S concatenados. (A) Distribuição total. (B) Clado 2. (C) Clado 3. Esp, esperado; Obs, observado.

O gráfico de distribuição dos *mismatches* mostra, para a distribuição total de *C. vacariensis* (figura 7A), um padrão multimodal, com dois picos altos de frequência e um menor entre eles, indicando a presença de mais de estruturação populacional. Assim, os gráficos foram gerados separadamente para os dois maiores clados (figuras 7B e 7C) e mostraram uma distribuição das diferenças nucleotídicas par-a-par entre as sequências semelhante ao esperado em populações que passaram por eventos de expansão populacional e/ou territorial (ROGERS & HARPENDING, 1992).

Análises filogenéticas

A análise por Máxima Parcimônia recuperou seis árvores mais parcimoniosas com 57 passos (CI = 89; RI = 91) e seu consenso estrito colapsou 14 nós (L = 66; CI = 77; RI = 77). A topologia desta árvore foi coincidente àquelas encontradas pelas análises de Máxima Verossimilhança (-ln = 1.476,15) e Bayesiana (-ln = 1.497,76). Neste trabalho, é apresentada apenas a árvore de BI (figura 8), já que as relações filogenéticas recuperadas são similares nas três análises, mostrando os quatro clados bem suportados. As exceções são as relações dentro do clado 3 (que variam bastante e apresentam suportes baixos) e uma politomia, na busca por ML, entre o grupo externo, o haplótipo de Candói/PR (clado 1) e os clados (2+3+4).

O clado 1, representado por um exemplar proveniente de Candói, aparece como grupo-irmão dos clados (2, (3, 4)). O clado 2 agrupa todos os exemplares de Capão Alto e São Joaquim e os seis restantes de Campo Belo do Sul. O clado 3 agrupa todos os indivíduos de Bom Jesus, Vacaria e Campestre do Tigre (São Francisco de Paula) e quatro indivíduos (de dez analisados) de Campo Belo do Sul. O clado 4 reúne os indivíduos de Jaquirana e Pedra Lisa (São Francisco de Paula).

As análises filogenéticas recuperaram os mesmos grupos apresentados pela rede de haplótipos, demonstrando concordância entre as abordagens.

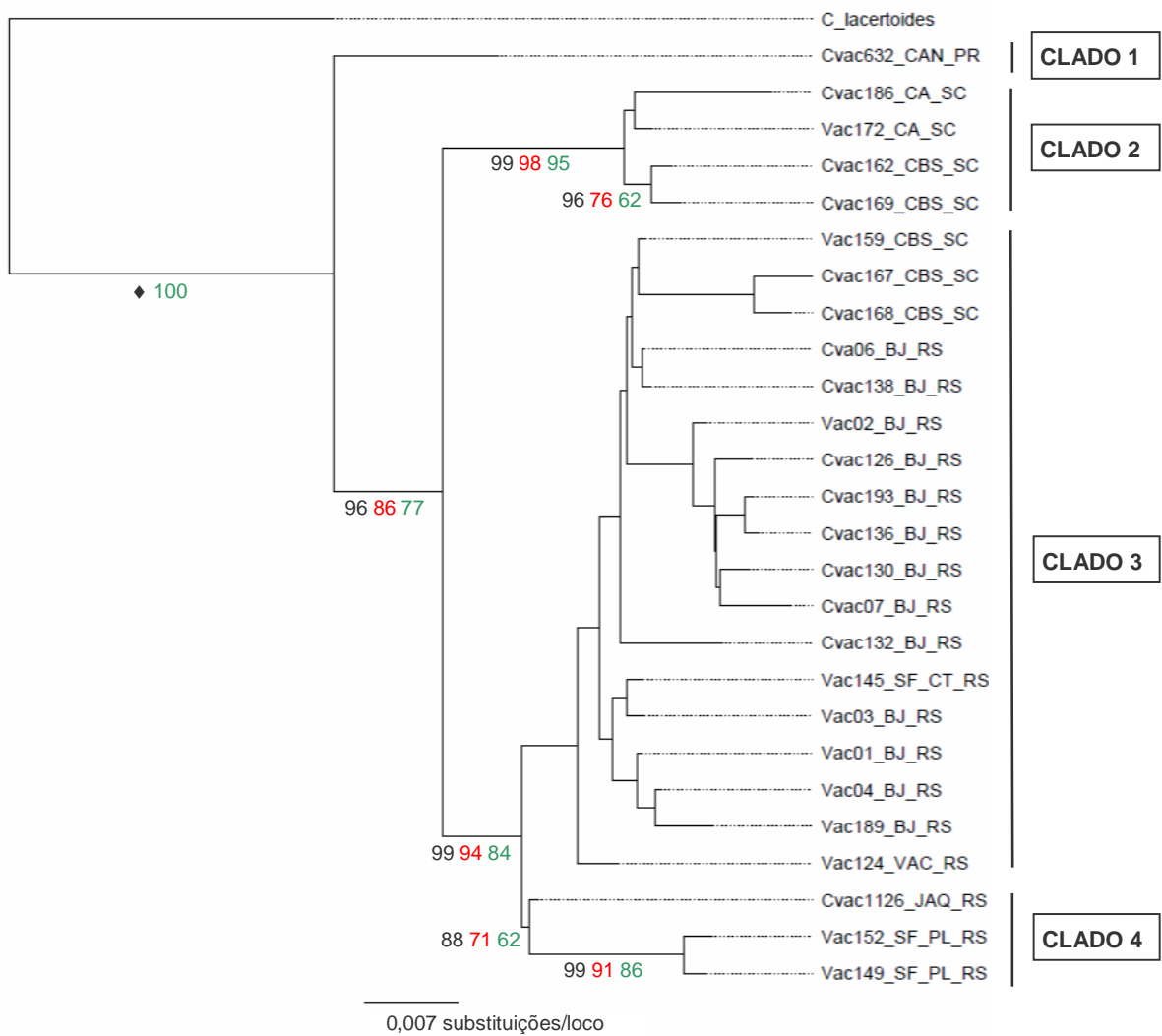


Figura 8. Relações filogenéticas recuperadas para *Cnemidophorus vacariensis* por análise Bayesiana (melhor árvore). Os números nos ramos indicam a probabilidade posterior para BI (em preto) e os valores de *bootstrap* para ML (em vermelho) e MP (em verde). ♦ Valor não informado para BI; clado não suportado para ML. CAN, Candói/PR; CA, Capão Alto/SC; CBS, Campo Belo do Sul/SC; SF PL, Pedra Lisa, São Francisco de Paula/RS; BJ, Bom Jesus/RS; VAC, Vacaria/RS; SF CT, Campestre do Tigre, São Francisco de Paula/RS.

V. 3. Análises Morfológicas

As variáveis morfológicas tomadas para os exemplares de *C. vacariensis* são apresentadas com os dados agrupados por localidade de coleta, mostrando média, desvio padrão e extremos das contagens (tabela 8). Os valores mostrados na tabela 8 foram arredondados para números inteiros em uma tentativa de se aproximar da realidade, já que os caracteres analisados têm distribuição discreta.

Os quatro primeiros eixos definidos pela RDA calculada com duas matrizes de dados (morfologia e localidade de coleta) explicaram 76,6% da variação encontrada (figura 9). Além disso, essa análise apontou que 72,3% da variação morfológica observada diz respeito à variabilidade intraespecífica não relacionada à localidade de coleta, enquanto que os 27,7% restantes encontram-se relacionados com o local de procedência dos indivíduos ($R^2 = 0,277$; $P = 0,0001$).

A representação gráfica dos dois primeiros eixos da RDA (figura 9) mostrou as localidades de Bom Jesus, Vacaria e Campestre do Tigre próximas entre si, no primeiro quadrante do diagrama. Pedra Lisa, Jaquirana e São Joaquim também apareceram próximas, no segundo quadrante do diagrama. Campo Belo do Sul e Capão Alto ficaram no terceiro quadrante, mostrando afinidade entre si, embora mais fraca que os outros agrupamentos. Candói ficou afastada das demais localidades, sendo a única localidade presente no quarto quadrante do diagrama. As variáveis que mais influenciaram essa organização foram as contagens dos escudos parietais e interparietal, das escamas supraciliares, das escamas infratibiais, das escamas ao redor da cauda e das escamas em contato com o perímetro externo das parietais e interparietal.

As amostras de Candói correlacionaram-se mais às contagens das escamas dorsais longitudinais e escamas dorsais transversais (figura 9), apresentando maior média para as duas variáveis e maior contagem absoluta para as escamas dorsais longitudinais (tabela 8). Quanto aos escudos parietais e interparietal, Candói apresentou a maior média entre todas as localidades (tabela 8) devido a alguns – seis, de um total de nove – exemplares analisados possuírem as escamas parietais divididas, às vezes na sua porção posterior (figura 10A) e, às vezes, anterior (figura 10B).

Tabela 8. Caracteres merísticos e poros femurais dos indivíduos de *Cnemidophorus vacariensis* das nove localidades amostradas. Valores indicam $\bar{x} \pm DP$, com mínimo e máximo entre parênteses.

Variáveis	Rio Grande do Sul					Santa Catarina			Paraná
	Bom Jesus (n = 13)	Vacaria (n = 6)	Campestre do Tigre* (n = 7)	Pedra Lisa* (n = 8)	Jaquirana (n = 7)	Campo Belo do Sul (n = 16)	Capão Alto (n = 16)	São Joaquim (n = 7)	Candói (n = 9)
Dorsais longitudinais	96 ± 5 (87–105)	97 ± 7 (85–103)	101 ± 6 (95–112)	95 ± 8 (88–113)	97 ± 6 (90–106)	97 ± 4 (91–103)	98 ± 6 (86–106)	96 ± 5 (89–103)	106 ± 7 (94–117)
Dorsais transversais	215 ± 9 (202–229)	214 ± 14 (193–237)	213 ± 10 (198–225)	215 ± 13 (195–235)	214 ± 4 (206–219)	220 ± 10 (201–234)	215 ± 8 (202–228)	213 ± 4 (208–219)	227 ± 6 (220–237)
Ventrais longitudinais	8 ± 1 (8–10)	10 ± 0 (9–10)	10 ± 1 (8–12)	10 ± 1 (9–10)	9 ± 1 (8–10)	9 ± 1 (8–11)	8 ± 0 (8–9)	10 ± 1 (8–10)	9 ± 1 (8–10)
Ventrais transversais	33 ± 1 (30–36)	33 ± 1 (31–34)	33 ± 1 (32–35)	33 ± 1 (31–34)	33 ± 1 (32–35)	32 ± 1 (30–36)	33 ± 1 (31–34)	32 ± 1 (31–35)	31 ± 1 (30–32)
Esc. parietais e interparietal	3 ± 0 (3–4)	4 ± 1 (3–5)	3 ± 0 (3–3)	3 ± 1 (3–5)	3 ± 0 (3–4)	3 ± 1 (3–5)	3 ± 0 (3–3)	3 ± 0 (3–3)	4 ± 1 (3–6)
Perímetro externo	21 ± 3 (16–25)	22 ± 2 (20–26)	18 ± 3 (15–22)	21 ± 2 (19–23)	20 ± 2 (17–23)	21 ± 2 (19–25)	21 ± 2 (16–23)	22 ± 2 (20–24)	24 ± 3 (20–29)
Supraoculares	3 ± 0 (3–4)	3 ± 0 (3–4)	4 ± 1 (3–4)	3 ± 1 (3–4)	4 ± 0 (3–4)	4 ± 1 (3–5)	3 ± 1 (3–4)	3 ± 0 (3–4)	3 ± 1 (3–4)
Supraciliares	5 ± 1 (4–5)	5 ± 1 (4–5)	4 ± 0 (4–5)	5 ± 1 (3–5)	5 ± 0 (5–5)	5 ± 0 (4–5)	5 ± 0 (5–6)	5 ± 1 (4–6)	4 ± 1 (3–5)
Supralabiais grandes	5 ± 1 (4–5)	5 ± 0 (5–5)	4 ± 1 (4–5)	5 ± 0 (4–5)	5 ± 1 (3–5)	5 ± 0 (5–6)	5 ± 0 (5–5)	5 ± 0 (5–6)	5 ± 1 (4–6)
Supralabiais pequenas	6 ± 1 (5–8)	8 ± 1 (6–10)	7 ± 1 (6–8)	6 ± 1 (5–8)	5 ± 1 (4–6)	6 ± 1 (4–7)	6 ± 1 (5–8)	6 ± 1 (5–7)	7 ± 1 (6–7)
Infralabiais grandes	5 ± 1 (4–6)	5 ± 0 (4–5)	5 ± 0 (4–5)	5 ± 1 (4–5)	5 ± 1 (5–6)	5 ± 0 (4–5)	5 ± 0 (5–5)	5 ± 0 (5–6)	5 ± 0 (5–5)
Infralabiais pequenas	5 ± 2 (2–10)	6 ± 1 (5–7)	5 ± 1 (4–7)	6 ± 1 (5–8)	5 ± 1 (4–7)	5 ± 1 (3–6)	5 ± 1 (3–6)	5 ± 1 (4–7)	5 ± 1 (4–6)
Pós-mentais	11 ± 1 (10–14)	11 ± 1 (10–12)	11 ± 2 (10–14)	12 ± 2 (10–14)	11 ± 1 (10–12)	10 ± 1 (8–12)	10 ± 1 (9–11)	10 ± 0 (10–11)	10 ± 0 (10–11)
Gulares granulares	34 ± 2 (30–38)	38 ± 4 (31–43)	33 ± 4 (27–39)	34 ± 2 (31–38)	39 ± 2 (38–42)	35 ± 3 (29–41)	35 ± 5 (28–44)	34 ± 3 (31–38)	37 ± 4 (32–44)
Gulares pós- mentais	29 ± 4 (22–33)	33 ± 3 (29–36)	30 ± 3 (27–35)	31 ± 4 (28–41)	28 ± 2 (26–30)	31 ± 4 (25–35)	29 ± 4 (23–35)	27 ± 8 (10–33)	33 ± 2 (30–37)
Mesoptiquiais	3 ± 0 (3–4)	3 ± 0 (2–3)	3 ± 1 (2–4)	4 ± 0 (3–4)	3 ± 0 (3–4)	3 ± 1 (2–4)	3 ± 0 (3–4)	3 ± 1 (3–4)	4 ± 1 (3–4)
Préfemurais	11 ± 1 (10–14)	12 ± 1 (11–14)	12 ± 1 (10–14)	13 ± 0 (13–14)	12 ± 1 (11–13)	12 ± 1 (11–13)	12 ± 1 (11–14)	12 ± 1 (12–13)	11 ± 1 (10–13)
Infratibiais	10 ± 1 (9–11)	9 ± 1 (7–10)	10 ± 1 (9–11)	8 ± 1 (7–9)	8 ± 1 (8–9)	8 ± 1 (7–9)	8 ± 1 (7–9)	8 ± 1 (7–9)	9 ± 1 (8–10)
Lamelas subdigitais*	25 ± 2 (22–30)	24 ± 1 (22–25)	23 ± 1 (21–25)	25 ± 1 (24–26)	23 ± 1 (22–25)	23 ± 2 (19–27)	22 ± 3 (13–26)	24 ± 1 (23–26)	24 ± 1 (23–26)
Lamelas subdigitais**	14 ± 1 (12–17)	17 ± 4 (13–25)	14 ± 1 (12–16)	15 ± 1 (14–16)	14 ± 1 (14–16)	14 ± 1 (12–17)	14 ± 2 (8–16)	15 ± 2 (13–17)	14 ± 1 (13–16)
Pré-cloacais grandes	4 ± 1 (3–7)	2 ± 1 (1–3)	3 ± 0 (3–3)	4 ± 1 (3–5)	5 ± 2 (3–7)	4 ± 2 (3–9)	3 ± 1 (1–7)	5 ± 2 (3–7)	3 ± 1 (1–4)
Pré-cloacais pequenas	1 ± 2 (0–6)	4 ± 2 (2–6)	5 ± 2 (4–7)	5 ± 2 (2–8)	2 ± 2 (0–6)	0 ± 1 (0–3)	5 ± 3 (0–9)	5 ± 3 (0–9)	4 ± 2 (0–6)
Ao redor da cauda	29 ± 2 (26–32)	28 ± 1 (27–29)	30 ± 2 (27–32)	29 ± 1 (27–30)	28 ± 2 (26–32)	27 ± 2 (24–30)	26 ± 2 (22–29)	27 ± 2 (26–31)	30 ± 2 (27–33)
Subcaudais	-	-	93 ± 1 (91–95)	92 ± 3 (89–95)	87 ± 4 (83–94)	91 ± 3 (86–95)	89 ± 3 (81–93)	90 ± 3 (85–91)	-
Poros femurais	10 ± 1 (8–12)	10 ± 1 (9–11)	10 ± 1 (9–11)	11 ± 1 (10–12)	10 ± 0 (10–11)	11 ± 1 (10–14)	10 ± 1 (9–12)	9 ± 1 (8–10)	10 ± 1 (8–11)

N, tamanho amostral. *Localidades do município de São Francisco de Paula. *Do 4° artelho do membro posterior. **Do 4° artelho do membro anterior.

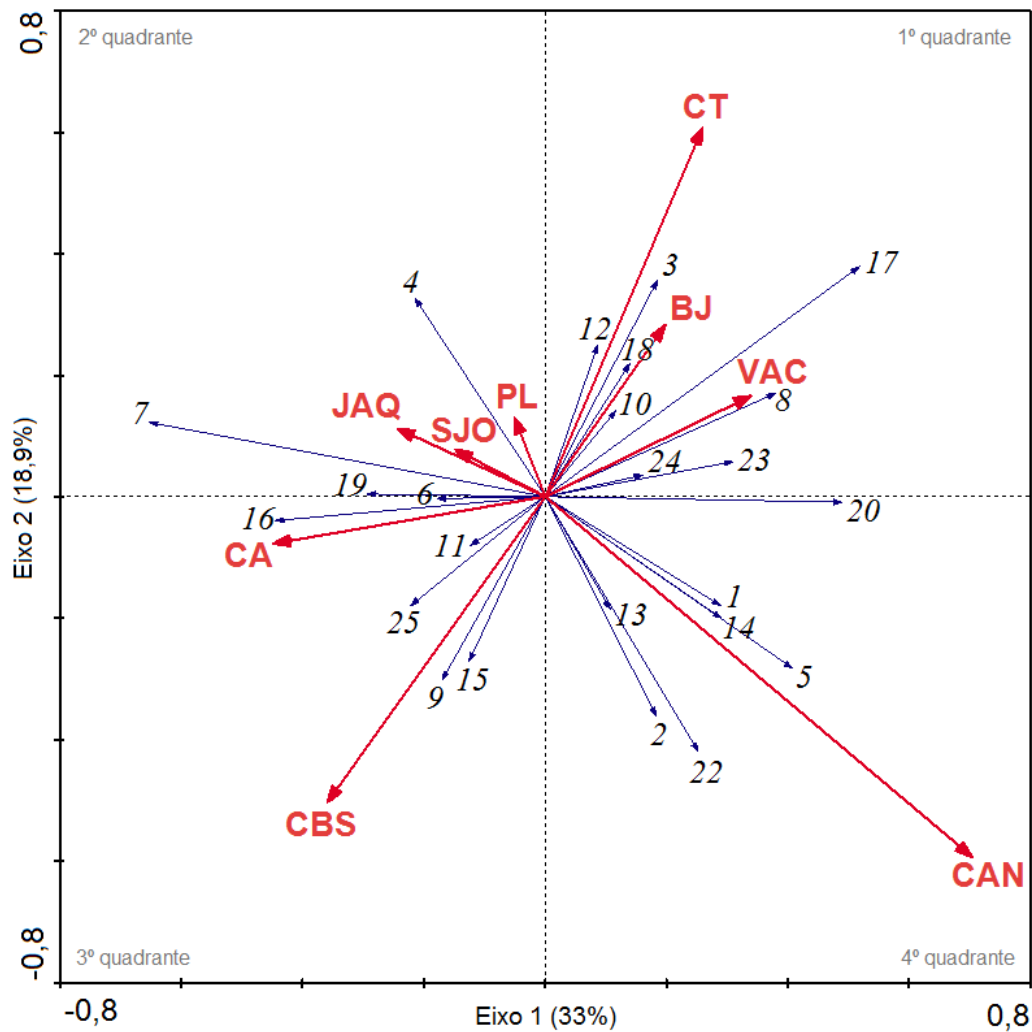


Figura 9. Diagrama representando os dois primeiros eixos da análise de redundância baseada nos caracteres morfológicos e localidades de coleta de *Cnemidophorus vacariensis*. O comprimento dos vetores é proporcional à sua importância e o ângulo entre um determinado vetor e cada eixo de ordenação representa o seu grau de correlação com o eixo. As setas e números em preto representam as variáveis morfológicas: 1, escamas dorsais longitudinais; 2, escamas dorsais transversais; 3, escudos ventrais longitudinais; 4, escudos ventrais transversais; 5, escudos parietais e interparietal; 6, escamas supraoculares; 7, escamas supraciliares; 8, escamas supralabiais pequenas; 9, escamas supralabiais grandes; 10, escamas infralabiais pequenas; 11, escamas infralabiais grandes; 12, soma das pós-mentais; 13, escamas gulares granulares; 14, escamas gulares granulares margeando as pós-mentais; 15, filas de escamas mesoptiquiais; 16, escamas pré-femurais; 17, escamas infratibiais; 18, escamas pré-cloacais pequenas; 19, escamas pré-cloacais grandes; 20, escamas ao redor da cauda; 22, escamas em contato com o perímetro externo das parietais/interparietal; 23, lamelas subdigitais do 4º artelho do membro posterior; 24, lamelas subdigitais do 4º artelho do membro anterior; 25, poros femurais. As setas e siglas em vermelho representam as localidades. No RS: BJ, Bom Jesus; JAQ, Jaquirana; CT, Campestre do Tigre, São Francisco de Paula; PL, Pedra Lisa, São Francisco de Paula; VAC, Vacaria; em SC: CA, Capão Alto; CBS, Campo Belo do Sul; SJO, São Joaquim. No PR: CAN, Candói.

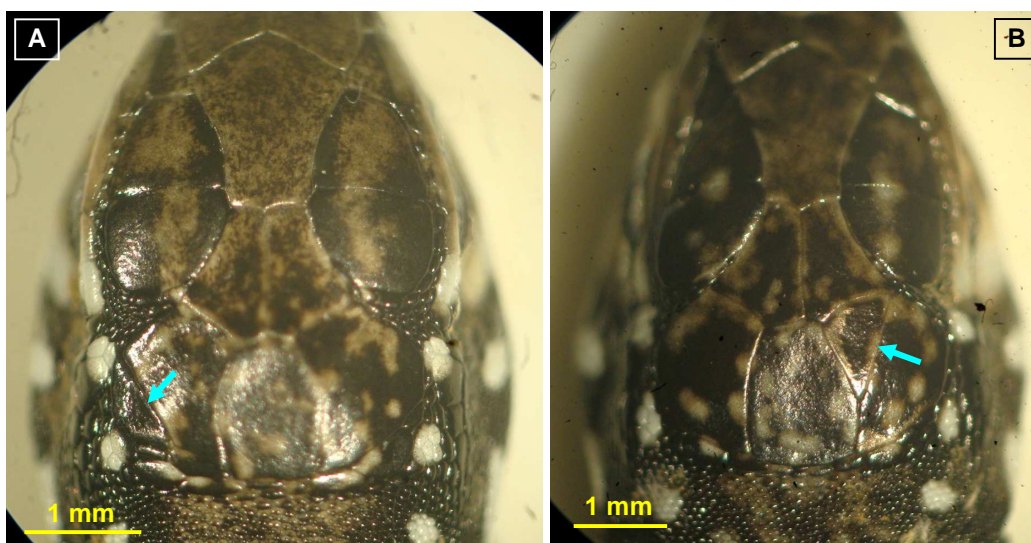


Figura 10. Vista dorsal da cabeça de exemplares de *Cnemidophorus vacariensis* procedentes de Candói, PR. A seta indica a escama parietal dividida.

Os três primeiros componentes da PCA explicaram 78% da variação observada, sendo 52% referente ao componente um. As variáveis que mais influenciaram a distribuição dos pontos no diagrama representando os dois primeiros componentes foram as escamas dorsais transversais e as escamas dorsais longitudinais. As variáveis gulares granulares, gulares granulares margeando as *chinshiels*, escamas ao redor da cauda e escamas em contato com o perímetro externo das parietais e interparietal também foram importantes. O diagrama de dispersão gerado pela PCA (figura 11) mostrou alta sobreposição entre os pontos, como esperado para indivíduos da mesma espécie, sendo que Candói apareceu um pouco mais discriminada das outras localidades, indicando tendência de separação da sua população em relação às demais.

O teste-t que comparou machos e fêmeas para o número de escamas dorsais transversais indicou que os dois conjuntos de amostras não são significativamente diferentes ($P = 0,694$). Já o teste-t para a comparação entre machos e fêmeas em relação às escamas dorsais longitudinais indicou diferença estatisticamente significativa ($P = 0,012$). Assim, optou-se por mostrar os gráficos de dispersão gerados tanto para machos e fêmeas separados como juntos (figura 12). Com a análise desses gráficos (figura 12), pôde-se ver que a distribuição dos pontos é contínua e que não é possível diferenciar os lagartos através dessas contagens de escamas.

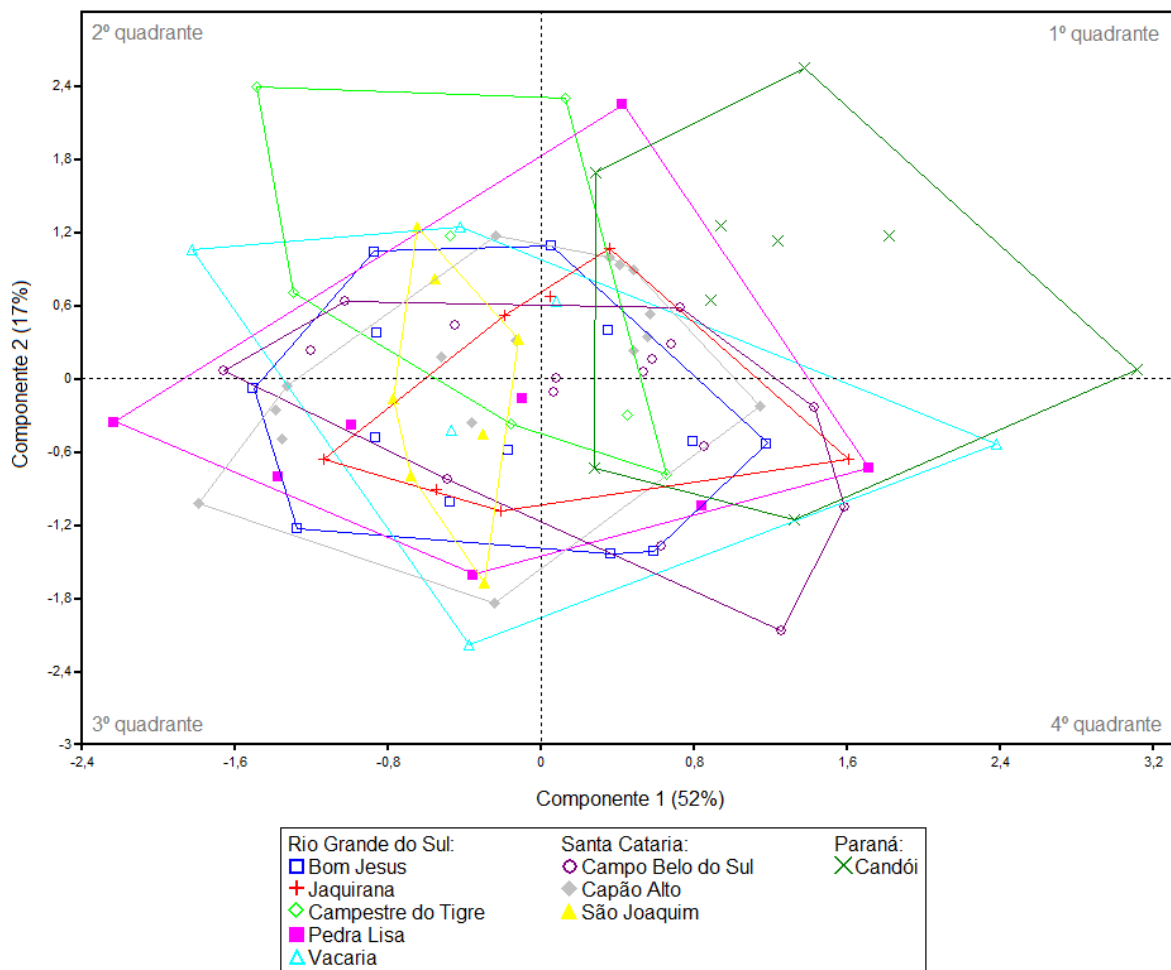


Figura 11. Diagrama representando os dois primeiros componentes da análise de componentes principais baseada nos caracteres morfológicos de *Cnemidophorus vacariensis*.

Para a localidade de Candói, é mostrado apenas um macho e uma fêmea nos gráficos das análises separadas pelo sexo, mas quando a análise é realizada pra os dois sexos reunidos, o tamanho amostral passa pra nove indivíduos. Isso se deve ao fato de que, dos nove exemplares coletados, sete são filhotes recém eclodidos dos ovos e não puderam ser sexados. Ainda, a fêmea adulta coletada em Candói foi danificada no momento da captura, tornando impossível a contagem das escamas dorsais transversais, motivo pelo qual esse dado está ausente da análise (figura 12C). Outro ponto a ser destacado refere-se ao número de losangos que aparecem nos gráficos: os losangos representando duas (ou mais) contagens idênticas, na mesma localidade, se sobrepõem e aparecem como apenas um losango.

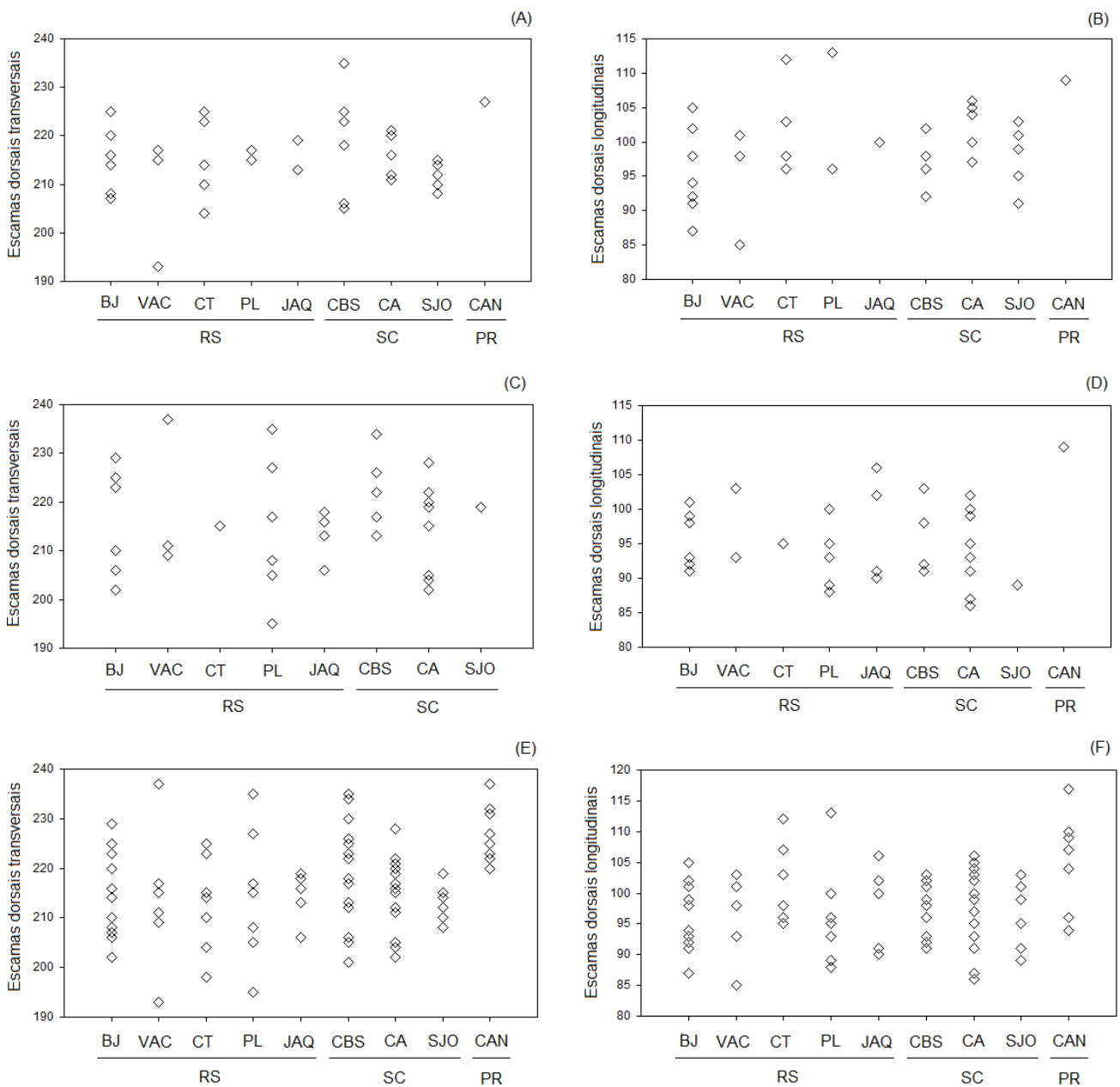


Figura 12. Gráficos de dispersão das contagens das escamas dorsais transversais e longitudinais por local de procedência das amostras de *Cnemidophorus vacariensis*. (A) e (B), valores para machos adultos e jovens; (C) e (D), valores para fêmeas adultas e jovens; (E) e (F) valores para machos e fêmeas adultas e jovens. BJ, Bom Jesus; VAC, Vacaria; CT, Campestre do Tigre, São Francisco de Paula; PL, Pedra Lisa, São Francisco de Paula; JAQ, Jaquirana; RS, Rio Grande do Sul; CBS, Campo Belo do Sul; CA, Capão Alto; SJO, São Joaquim; SC, Santa Catarina, CAN, Candói; PR, Paraná.

VI. DISCUSSÃO

VI. 1. Diversidade molecular e testes de neutralidade

Dos 326 pares de base (pb) analisados para o gene 12S de *C. vacariensis*, 16 sítios foram polimórficos. Padrão semelhante foi registrado com o mesmo segmento para *Aspidoscelis tigris*, gênero-irmão de *Cnemidophorus*, para o qual 7-17 sítios polimórficos foram identificados, de um total de 368 pb analisados (DESSAUER *et al.*, 2000). Para *Lacerta dugesii* (Família Lacertidae), foram registrados 30 sítios polimórficos, dos 371 pb analisados para 12S (BREHM *et al.*, 2003). Para o gene 16S, dos 466 pb analisados em *C. vacariensis*, 27 sítios foram polimórficos. POULAKAKIS *et al.* (2005) registraram 76 sítios variáveis para 16S e 135, para citocromo *b*, de um total de 925 pb analisados em estudo com *Podarcis taurica* (Família Lacertidae).

Com os segmentos tratados juntos, 42 locos foram polimórficos, dos 792 analisados. OKAMOTO & HIKIDA (2009) encontraram valores mais altos de sítios polimórficos para o scincídeo *Plestiodon japonicus* (12S: 67 pb de 385 pb analisados; 16S: 68 pb de 430 pb analisados), porém os autores sugeriram que essa espécie deva passar por uma revisão taxonômica, pois compreende três linhagens genéticas parapátricas. PERERA & HARRIS (2010) estudaram a variabilidade genética do gekkonídeo africano *Ptyodactylus oudrii* e relataram taxas ainda mais altas de polimorfismo das sequências mitocondriais (12S + 16S: 352 sítios variáveis, de 885 pb analisados), o que se deve, provavelmente, a esta espécie também representar um complexo de espécies ou aos altos níveis de divergência genética registrados para os gekkonídeos (HARRIS *et al.*, 2004; RATO & HARRIS, 2008)

Para lagartos teídeos, no entanto, as taxas de polimorfismo para os genes 12S e 16S parecem ser mais baixas, como as reportadas para *Ameiva chrysolema* (154 pb variáveis, dos 1.193 pb analisados para 12S e 16S) (GIFFORD *et al.*, 2004), *Aspidoscelis tigris* (DESSAUER *et al.*, 2000) e *C. vacariensis* (este estudo). Para *Cnemidophorus vanzoi*, lagarto endêmico de duas ilhas caribenhas, FUNK & FA (2006) não encontraram nenhuma variação no fragmento de 12S analisado e apenas dois haplótipos para o segmento de 16S.

A diversidade haplotípica encontrada neste estudo para os segmentos 12S e 16S combinados é semelhante às aquelas descritas por VICTORIANO *et al.* (2008) para o citocromo *b* e 12S em três espécies chilenas do gênero *Liolaemus* (Família Liolaemidae). YOKE *et al.* (2006) analisaram a estrutura genética de *Cnemidophorus longicauda* através do gene mitocondrial ND4 e encontraram valores semelhantes de diversidade haplotípica. Porém, *C. vacariensis* exibe níveis menores de diversidade nucleotídica quando comparada aos dois estudos supracitados.

Conforme descrito por MARJORAM & DONNELLY (1994), gráficos de *mismatch* multimodais podem indicar que a amostra analisada representa mais de uma população e que estas estão separadas geograficamente, como foi verificado no gráfico feito para a amostra total de *C. vacariensis* (Fig. 5A) e corroborado pelas análises filogenéticas, rede de haplótipos e pela distribuição geográfica da espécie. Quando a separação dos picos na análise par-a-par é grande (*i.e.*, este estudo), há indícios de que ou a taxa de migração é muito baixa ou o tamanho populacional inicial é alto (MARJORAM & DONNELLY, 1994). Para as populações representadas nos clados 2 e 3, pode-se inferir que estas passaram por eventos recentes de expansão populacional e/ou territorial (figuras 6B e 6C) (ROGERS & HARPENDING, 1992).

VI. 2. Estruturação populacional

O padrão filogeográfico básico de *C. vacariensis* é caracterizado pela presença de quatro principais linhagens genéticas, com correspondência geográfica bem definida e possível presença de pouco fluxo gênico. A AMOVA revelou que a divergência genética entre os clados 2, 3 e 4 não é profunda, como registrado para *Cnemidophorus longicauda* (YOKE *et al.*, 2006) e, ainda, que a variabilidade genética encontrada não se deve essencialmente à divisão nos clados 2, 3 e 4 e indica que as populações dentro dos clados são bem variáveis (24,45%).

Como indicado pelos resultados deste trabalho, *C. vacariensis* exibiu um padrão de estruturação genética. Na árvore dos genes 12S e 16S concatenados, a população da parte norte da distribuição geográfica da espécie ficou separada das populações do resto da sua distribuição. Essa separação é fortemente suportada pela análise de MP, mas não pôde ser resolvida por ML. A divergência dos clados 2 e (3, 4) é bem suportada por BI e menos

suportada pelas análises de ML e MP; e a separação dos clados 3 e 4 tem alto suporte por BI e ML e menos por MP.

As populações estudadas apresentaram-se semelhantes morfologicamente, concordando com o fato de pertencerem a uma única espécie. Em relação a Candói/PR, cuja separação das populações do sul é mais antiga, verificou-se a existência de uma tendência à diferenciação morfológica que se reflete em alguns caracteres observados. As demais populações não puderam ser discriminadas, mas apresentaram relações semelhantes, em parte, àquelas exibidas pela rede de haplótipos.

Ao comparar a RDA com a rede de haplótipos, observou-se que as três localidades gaúchas que compartilham haplótipos (Vacaria, Bom Jesus e Campestre do Tigre) apareceram próximas no diagrama da RDA. Pedra Lisa e Jaquirana, que pertencem ao clado 4, também ficaram próximas e no mesmo quadrante no diagrama da RDA – a exceção é São Joaquim, que pertence ao clado 2 e, no diagrama da RDA, ficou bem próximo à Jaquirana. As localidades do clado 2 não ficaram unidas como as dos clados 3 e 4, mas ainda assim exibiram correlação semelhante com os caracteres. A localidade de Candói mostrou-se isolada nas duas análises: na rede de haplótipos, ficou mais de 10 passos mutacionais distante dos outros clados, enquanto na RDA, seu vetor assumiu posição única, indicando correlação com variáveis diferentes daquelas com as quais as outras localidades se relacionaram.

O cruzamento dos resultados das análises filogenéticas e morfológicas indicou que a estruturação mostrada pela árvore dos genes mitocondriais pode ser identificada morfolologicamente, ainda que de maneira sutil e com breves diferenças. A árvore de DNA mitocondrial parece refletir adequadamente a história evolutiva da espécie, uma vez que há concordância entre os dados moleculares e morfológicos. Estudos com genes nucleares poderiam por a prova essa sugestão ao verificar se a filopatria detectada para as fêmeas ocorre também para os machos de *C. vacariensis* ou se estes últimos estariam agindo como homogeneizadores das populações. Com esses conhecimentos, poder-se-á estabelecer estratégias mais adequadas para a elaboração de um plano de manejo para *C. vacariensis*.

O fator predominante na determinação da estruturação encontrada no presente estudo deve-se à história de vida de *C. vacariensis*. CARUCCIO (2008) estudou a área de

vida de uma população de lagartos dessa espécie em dois afloramentos rochosos separados por uma estrada de areia. Ainda que machos se desloquem mais que fêmeas e jovens, não foi registrado o deslocamento de nenhum indivíduo entre os afloramentos monitorados (CARUCCIO, 2008). No mesmo estudo, CARUCCIO (com. pess.) relatou que, em três ocasiões, recapturou indivíduos na mesma rocha do local da captura, indicando uma relação estreita destes animais com seu microhabitat. Esses conhecimentos, associados aos resultados do presente trabalho, apontam para a existência de um fluxo migratório muito baixo entre as populações de *C. vacariensis*.

VI. 3. Biogeografia

Do Paleoceno Superior ao Pleistoceno Inferior, o clima no sul da América do Sul passou de quente, úmido e não-sazonal para frio, seco e sazonal, e os biomas alteraram-se de florestas tropicais para estepes (ORTIZ-JAUREGUIZAR & CLADERA, 2006). Foi nesse cenário que ocorreu a diversificação do complexo *lacertoides* (sem as espécies do litoral), principalmente durante o Plioceno (GIUGLIANO, 2009), em uma época conhecida como a Idade das Planícies Sulinas (*Age of the Southern Plains* [ORTIZ-JAUREGUIZAR & CLADERA, 2006]).

No Quaternário, como uma consequência dos ciclos glaciais, o clima frio e seco desse período era interrompido por fases quentes e úmidas, gerando pulsos de expansão e retração dos biomas abertos, ora isolando-os, ora reconectando-os (KALIN-ARROYO *et al.*, 1988; ORTIZ-JAUREGUIZAR & CLADERA, 2006). Essa oscilação de dominância entre campo e floresta poderia ter fragmentado por diversas vezes o domínio geográfico de *C. vacariensis*, como sugere a presença de vários haplótipos exclusivos, ou compartilhados entre poucas localidades. A baixa densidade amostral pode ser uma razão para tal resultado, porém outra explicação reside na dinâmica das populações pequenas e isoladas, que tendem a perder haplótipos mais rapidamente devido à deriva genética (RIDLEY, 2006). Como os indivíduos de *C. vacariensis* exibem uma forte associação com seu microhabitat e deslocam-se pouco entre os afloramentos rochosos, faixas de floresta poderiam isolar populações próximas e antes conectadas, impedindo a migração e o fluxo gênico entre elas.

Uma possível relação histórica entre as populações analisadas neste estudo é descrita a seguir, de maneira especulativa. No clado 3, o haplótipo ancestral mais provável

é aquele compartilhado pelas localidades gaúchas de Vacaria e Campestre do Tigre e por Campo Belo do Sul/SC. Assim, a população inicial estava em Campestre do Tigre e migrou em direção ao norte, primeiramente para Vacaria e Campo Belo do Sul/SC e, em um segundo momento, de Vacaria para Bom Jesus. O compartilhamento de haplótipos ancestrais entre Vacaria, Bom Jesus, Campestre do Tigre e Campo Belo do Sul pode indicar que, em um período passado, o Rio Pelotas não constituiu uma barreira geográfica para a dispersão da espécie. O Plioceno e o Pleistoceno foram épocas de clima seco e frio no sul da América do Sul (ORTIZ-JAUREGUIZAR & CLADERA, 2006) e em períodos de glaciação, quando o clima ficava ainda mais frio e seco e o mar se afastava da linha da costa, é possível que a vazão dos rios diminuísse e até cessasse, permitindo que a fauna cruzasse suas margens.

Com relação às populações gaúchas de Pedra Lisa e Jaquirana, tem-se um cenário interessante: Pedra Lisa está a 11 quilômetros de Campestre do Tigre, mas exhibe haplótipos mais distintos que aqueles presentes em Jaquirana, que está a 43 quilômetros de Campestre do Tigre. Para explicar este padrão, duas hipóteses parecem possíveis, porém estas devem ser consideradas com cautela devido ao baixo tamanho amostral analisado (cinco exemplares para Pedra Lisa e quatro, para Jaquirana). (1) A população inicial estava em Jaquirana e migrou em direção ao oeste, para Pedra Lisa, ou (2) a população inicial estava em Pedra Lisa e migrou em direção ao leste, para Jaquirana. Nos dois casos, os possíveis haplótipos compartilhados entre as localidades não foram amostrados – talvez devido à aleatoriedade da amostragem ou à sua ausência na população. A localidade de Jaquirana foi amostrada duas vezes e, em ambas expedições a campo, o número de indivíduos encontrados foi baixo indicando, possivelmente, que sua população seja pequena. Se tal suposição for verdadeira, Jaquirana pode já ter perdido o haplótipo que está presente em Pedra Lisa por deriva genética. A proximidade geográfica de Pedra Lisa e Campestre do Tigre e a concomitante ausência de compartilhamento de seus haplótipos compõem um cenário interessante que deve ser analisado com mais profundidade para que seja possível uma melhor compreensão das relações filogenéticas entre suas populações, assim como dos processos envolvidos em seu possível isolamento. Atualmente, os cursos do Rio Tainhas e de seu afluente Arroio dos Novilhos passam entre as populações de Jaquirana e Pedra Lisa, enquanto o Arroio São Tomé (afluente do Rio das Antas) passa entre as populações de

Pedra Lisa e Campestre do Tigre. Esses rios atuam como barreiras ao fluxo migratório dos lagartos *C. vacariensis*, porém, como mencionado na página anterior, em outros períodos eles podem não ter representado um fator de isolamento.

No clado 2, o mais provável haplótipo ancestral é aquele presente em Capão Alto e São Joaquim. Na nossa hipótese, a população inicial estava em São Joaquim e migrantes foram primeiro para Capão Alto e, em seguida, para Campo Belo do Sul. Em Campo Belo do Sul, os lagartos encontraram um ambiente que favoreceu a expansão populacional, o que se infere pela presença de haplótipos pouco frequentes e próximos (*i.e.*, um passo mutacional) aos haplótipos ancestrais (figura 6).

A partir do Holoceno Superior, houve um aumento na quantidade e frequência das precipitações, permitindo o início da expansão da Floresta com Araucária de refúgios ao longo de rios sobre o campo (BEHLING *et al.*, 2009). Conforme esses autores, as condições climáticas atingiram níveis semelhantes aos atuais há cerca de 1.000-1.500 anos, quando se deu a franca expansão da Floresta com Araucária sobre o campo, inclusive em áreas elevadas.

Assim, desde a diversificação do grupo *lacertoides*, *C. vacariensis* experimentou ciclos de alternância entre o campo e a floresta, mas o seu habitat passou a ser mais marcadamente ameaçado a partir do Holoceno. No Holoceno Superior, a floresta iniciou um período de expansão sobre o campo, fragmentando-o e, no Holoceno Inferior e Médio, deu-se a ocupação do Planalto Sul-Brasileiro pelos primeiros ameríndios, provavelmente os responsáveis pelo aumento da frequência de ocorrência de fogo nos campos – antes raros, iniciados por relâmpagos (BEHLING & PILLAR, 2007).

VI. 4. Conservação

Mais recentemente, com a chegada dos imigrantes europeus no sul do Brasil, a pecuária foi introduzida na região dos Campos de Cima da Serra como a principal atividade dos colonos. O pastejo do gado afetou a vegetação diretamente pela remoção da biomassa e pisoteio, e indiretamente influenciando a intensidade e a frequência das queimadas à medida que alterava a acumulação de biomassa inflamável no ambiente (PILLAR & QUADROS, 1997; FUHLENDORF & ENGLE, 2004 *apud* BEHLING *et al.*, 2007). Associadas à criação de gado, as queimadas são praticadas há aproximadamente 150 anos

no final de cada inverno ou a cada dois anos e, provavelmente, tem selecionado espécies vegetais e animais que apresentam mecanismos de escape ou defesa frente a esse distúrbio (JACQUES, 2003).

CARUCCIO (2008) relatou que os indivíduos de *C. vacariensis* são capazes de coexistir com o gado e podem se abrigar das queimadas embaixo de pedras, como registrou na área em que conduziu seu estudo em Bom Jesus. Durante o Plioceno-Pleistoceno, a fauna do sul da América do Sul era composta por grandes mamíferos pastadores (ORTIZ-JAUREGUIZAR & CLADERA, 2006), logo é possível que *C. vacariensis* tenha evoluído e se adaptado sob pressões semelhantes às que enfrenta atualmente em uma área com presença de gado.

Entre os distúrbios que os Campos de Cima da Serra sofrem, a silvicultura de espécies exóticas é o que tem maior impacto sobre a paisagem campestre e, provavelmente, também sobre *C. vacariensis*. Em tendência contrária às queimadas e à pecuária, que podem atuar na manutenção da paisagem campestre (BEHLING *et al.*, 2009), a monocultura de árvores exóticas promove o isolamento cada vez maior das áreas de campo (ZILLER & GALVÃO, 2001). Como os campos são formações remanescentes de um período glacial e do Holoceno Inferior e Médio, BEHLING *et al.* (2009) sugerem que estes devam ser protegidos e não sujeitos a florestamentos como está acontecendo no presente momento, onde vastas áreas de campo estão sendo substituídas por florestas de *Pinus*, *Eucalyptus* e *Acacia*.

Os lagartinhos-pintados ocorrem em afloramentos rochosos pouco extensos de modo que Unidades de Conservação de pequeno tamanho poderiam ser efetivas para a sua conservação. GHIZONI *et al.* (2009) coletaram um indivíduo de *C. vacariensis* sob lascas de pedra em um afloramento rochoso às margens da rodovia BR-116. No entorno do local de coleta havia pastagens a perder de vista, de forma que aqueles afloramentos com vegetação campícola remanescente somente resistiram por estar à margem da rodovia, fora dos limites das propriedades particulares destinadas a pecuária (BÉRNILS, com. pess.).

Outro local de registro de *C. vacariensis* é um afloramento rochoso localizado no Município de Vacaria (28°33'S, 50°42'W) dentro de uma propriedade particular na qual a monocultura de pinus ocorre desde 2002/2003. A população de *C. vacariensis* dessa área

foi objeto de estudo de trabalhos com dieta e reprodução, quando a plantação das árvores exóticas estava em estágio inicial, entre 2004 e 2006. Em 2009, quando a região foi visitada novamente, não foi possível ver os afloramentos rochosos a partir da estrada, pois as árvores de pinus já estavam altas, de modo que só foi possível chegar nessa região porque a mesma era conhecida pelos pesquisadores (SCHOSSLER, com. pess.). Os afloramentos rochosos pequenos localizados nas áreas florestadas ficam completamente sombreados em pouco tempo (*i.e.*, menos de dez anos), o que afeta diretamente a termorregulação dos lagartos da espécie *C. vacariensis* – que são tigmotérmicos, ou seja, usam o calor armazenado pelas rochas como principal fonte de calor.

A definição de ESUs e MUs

Para usar a informação genética corretamente, deve-se distinguir entre dois tipos de unidades de conservação, ambas importantes para o manejo: ESUs, mais inclusivas, com foco na estrutura populacional histórica e nas necessidades da conservação a longo prazo; e MUs, menos inclusivas, com foco na estrutura populacional atual e em questões de manejo a curto prazo. Para o reconhecimento de ESUs, MORITZ (1994) sugere que estas devam ser reciprocamente monofiléticas para o DNA mitocondrial e mostrar divergência significativa nas frequências de alelos nucleares, evitando a classificação errônea de populações ligadas por fluxo genético nuclear mas não mitocondrial.

Embora este estudo não tenha abrangido marcadores nucleares, sugere-se que as populações de *C. vacariensis* presentes em Candói (PR), Jaquirana e Pedra Lisa (RS) sejam consideradas ESUs, já que apresentam monofilia com relação ao haplótipo mitocondrial analisado. Conforme a divergência apresentada nas comparações dos valores de F_{ST} , as demais populações podem ser consideradas MUs; e sugere-se que Vacaria e Bom Jesus sejam consideradas como uma única MU, tanto por não divergirem quanto ao valor de F_{ST} como por serem muito próximas geograficamente (6 quilômetros).

A exemplo da variabilidade mitocondrial exibida pelas populações estudadas de *C. vacariensis*, pode-se inferir que a região dos Campos de Cima da Serra tem grande importância como fonte de diversidade genética e representa uma história evolutiva única que não deve ser negligenciada. Os resultados apresentados neste trabalho somados aos conhecimentos prévios acerca da história de vida de *C. vacariensis* fornecem subsídios para

a implantação de Unidades de Conservação que protejam essa espécie e os Campos de Altitude, enquanto as crescentes ameaças que esse habitat vem sofrendo tornam tais medidas urgentes.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AB'SÁBER, A. N. 1970. Províncias geológicas e domínios morfoclimáticos no Brasil. **Geomorfologia** 20: 1-26.
- AKAIKE, H. 1974. **IEEE Transactions on Automatic Control**. P. 716–723.
- ALBERTS, B.; A. JOHNSON; J. LEWIS; M. RAFF; K. ROBERTS & P. WALTER. 2002. **Molecular Biology of the Cell**. New York, Garland Science.
- AVILLA-PIRES, T.C.S. 1995. Lizards of Brazilian Amazonia (Reptilia: Squamata). **Zoologische Verhandelingen**. Leiden 299. P. 491-564.
- AVISE, J.C. 1998. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. **Molecular Ecology** 7 (4): 371-379.
- AVISE, J.C. 2000. **Phylogeography: The history and formation of species**. London, Harvard University Press.
- BANDELT H.J. & R.A. FORSTER P. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution** 16: 37-48.
- BEHLING, H.; JESKE-PIERUSCHKA, V.; SCHÜLER, L. & V.P. PILLAR. 2009. Dinâmica dos campos no sul do Brasil durante o Quaternário Tardio. *IN: PILLAR, V.P.; MULLER, S.C.; CASTILHOS, Z.M.S. & A.V.A. JACQUES (EDS). Campos Sulinos – conservação e uso sustentável da biodiversidade*. Brasília, MMA. P. 12-25.
- BEHLING, H. & PILLAR, V.D.P. 2007. Late Quaternary vegetation, biodiversity and fire dynamics on the southern Brazilian highland and their implication for conservation and management of modern *Araucaria* forest and grassland ecosystems. **Philosophical Transactions of the Royal British Society** 362: 243-251.
- BERMINGHAM, P. & C. MORITZ. 1998. Comparative phylogeography: concepts and applications. **Molecular Ecology** 7 (4): 367-370.
- BÉRNILS, R.S.; J.C. MOURA-LEITE & S.A.A. MORATO. 2004. Répteis. *IN: MIKICH, S.B. & R.S. BÉRNILS (EDS). Livro vermelho da fauna ameaçada do Estado do Paraná*. Curitiba, Instituto Ambiental do Paraná. 764 P.
- BONVICINO, C.R. & M.A.M. MOREIRA. 2001. Molecular phylogeny of the genus *Oryzomys* (Rodentia: Sigmodontinae) based on *cytochrome b* DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 18 (2): 282-292.
- BREHM, A.; JESUS, J.; SPÍNOLA, H.; ALVES, C.; VICENTE, L. & HARRIS, D.J. 2003. Phylogeography of the Madeiran endemic lizard *Lacerta dugesii* inferred from mtDNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 26: 222-230.

- BROWN, W.M. 1985. The mitochondrial genome OF ANIMALS, P. 95-130. *IN: MAC INTYRE, R.J. (ED.). Molecular Evolutionary Genetics*. New York, Ed. Plenum.
- BROWN, W.M.; M.J.R. GEORGE & A.C. WILSON. 1979. Rapid Evolution of Animal Mitochondrial DNA. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America** 76: 1967-1971.
- CABRERA, M.R. 2004. A new species of *Cnemidophorus* (Squamata: Teiidae) from western Argentina. **Amphibia-Reptilia** 25: 265-275.
- CABRERA, M.R. & CARREIRA, S. 2009. A new, but probably extinct, species of *Cnemidophorus* (Squamata: Teiidae) from Uruguay. **Herpetological Journal** 19: 97-105.
- CARUCCIO, R. 2008. **Ecologia de *Cnemidophorus vacariensis* Feltrim & Lema, 2000 (Squamata, Teiidae) nos campos do planalto das araucárias do Rio Grande do Sul, Brasil: atividade, uso do microhabitat e área de vida**. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, UFRGS.
- CARUCCIO, R.; VIEIRA, R.C. & L. VERRASTRO. No prelo. Microhabitat use by *Cnemidophorus vacariensis* (Squamata, Teiidae) in the grasslands of the Araucaria Plateau, Rio Grande do Sul state, Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**
- CEI, J.M. 1993. Reptiles del noroeste, nordeste y este de la Argentina. **Museo Regionale di Scienze Naturali Torino** 14: 1-949.
- CEI, J. M., & G. SCROCCHI. 1991. A poorly known and discussed species, *Cnemidophorus leachei* Peracca 1897, and general remarks on the genus *Cnemidophorus* in Argentina (Lacertilia, Teiidae). **Bolletino del Museo Regionale di Scienze Naturali di Torino** 9: 233-244.
- CEI, J.M. & R.A. MARTORI. 1991. A new species of *Cnemidophorus* of the *lacertoides* group from the eastern sierras de Córdoba, Central Argentina (Lacertilia, Teiidae). **Bollettino del Museo Regionale di Scienze Naturali di Torino** 9: 33-38.
- COLLI, G.R.; COSTA, G.C.; GARDA, A.A.; KOPP, K.A.; MESQUITA, D.O.; PÉRES, A.K. JR.; VALDUJO, P.H.; VIEIRA, G.H.C. & H.C. WIEDERHECKER. 2003. A critically endangered new species of *Cnemidophorus* (Squamata, Teiidae) from a cerrado enclave in southwestern Amazonia, Brazil. **Herpetologica** 59 (1): 76-88.
- COLLI, G.R.; GIUGLIANO, L.G.; MESQUITA, D. O. & F.G.R. FRANÇA. 2009. A new species of *Cnemidophorus* from the Jalapão region, in the central Brazilian Cerrado. **Herpetologica** 65: 311-327.
- DESSAUER, H.C.; COLE, C.J. & TOWNSEND, C.R. 2000. Hybridization among western whiptail lizards (*Cnemidophorus tigris*) in southwestern New Mexico: population genetics, morphology, and ecology in three contact zones. **Bulletin of the American Museum of Natural History** 246: 1-148.

- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; S. SCHNEIDER. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online** 1: 47-50.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.; J. QUATTRO. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics** 131: 479-491.
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence Limits on Phylogenies: an approach using the Bootstrap. **Evolution** 39: 783-791.
- FELTRIM, A.C. & T.D. LEMA. 2000. Uma nova espécie de *Cnemidophorus* Wagler, 1830 do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil (Sauria, Teiidae). **Biociências** 8 (1): 103-114.
- FLUXUS TECHNOLOGY LTD. 2009. Disponível em www.fluxus-technology.com/; acesso em junho de 2009.
- FONTANA, C.S.; G.A. BENCKE & R.E. REIS (Eds.). 2003. **Livro vermelho da fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, EDIPUCRS. 632 P.
- FU, Y.-X. (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics** 147: 915-925.
- FUHLENDORF, S.D. & D.M. ENGLE. 2004. Application of the firegrazing interaction to restore a shifting mosaic on tallgrass prairie. **Journal of Applied Ecology** 41: 604-614.
- FUNK, S.M. & FA, J.E. 2006. Phylogeography of the endemic St. Lucia whiptail lizard *Cnemidophorus vanzoi*: Conservation genetics at the species boundary. **Conservation Genetics** 7: 651-663.
- GHIZONI, I.R.JR.; KUNZ, T.S.; CHEREM, J.J. & R.S. BÉRNILS. 2009. Registros notáveis de répteis de áreas abertas naturais do planalto e litoral do Estado de Santa Catarina, sul do Brasil. **Biotemas** 22 (3): 129-141.
- GIFFORD, M.E.; POWELL, R.; LARSON, A. & R.L. GUTBERLET JR. 2004. Population structure and history of a phenotypically variable teiid lizard (*Ameiva chrysolema*) from Hispaniola: the influence of a geologically complex island. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 32: 735-748.
- GIUGLIANO, L.G. 2009. Filogenia e Evolução de Teiidae (Squamata: Reptilia) com ênfase em *Cnemidophorus*. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, UnB. 3º capítulo: 77-135.
- GOLOBOFF, P. (ED.). 1999. **NONA (NO NAME) v.2**. Tucumán, Argentina.
- GREEN, P. 1999. Phrap. Disponível em <http://phrap.org>; acesso em março de 2009.

- GREEN, P. & B. EWING. 2002. Phred. Disponível em <http://phrap.org>; acesso em março de 2009.
- HAMMER, Ø.; D.A.T. HARPER & P.D. RYAN. 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica** 4 (1): 1-9.
- HARRIS, D.J., BATISTA, V., LYMBERAKIS, P. & M.A. CARRETERO. 2004. Complex estimates of evolutionary relationships in *Tarentola mauritanica* (Reptilia: Gekkonidae) derived from mitochondrial DNA sequence. **Molecular Phylogenetics Evolution** 30: 855-859.
- HIGGINS, D.; THOMPSON, J.; GIBSON, T.; THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G. & T.J. GIBSON. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research** 22: 4673-4680.
- HUELSENBECK, J.P. & B. RANNALA. 2004. Frequentist Properties of Bayesian Posterior Probabilities of Phylogenetic Trees Under Simple and Complex Substitution Models. **Systematic Biology** 53 (6): 904-913.
- IBAMA. 2003. Lista nacional das espécies da fauna brasileira ameaçada de extinção. Disponível em www.ibama.gov.br; acesso em abril de 2008.
- JACQUES, A.V.A. 2003. A queima das pastagens naturais – efeitos sobre o solo e a vegetação. **Ciência Rural** 33: 177-181.
- JANDEL CORPORATION. 2006. **Sigmastat Statistical Software para Windows**, v.3.5. San Rafael, CA: Jandel Corporation.
- KALIN-ARROYO, M.T.; SQUEO, F.A.; ARMESTO, J.J. & C. VILLAGRA'N. 1988. Effects of aridity on plant diversity in the northern Chilean Andes: results of a natural experiment. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 75: 55-78.
- LI, W.H. & D. GRAUR. 2000. **Fundamentals of molecular evolution**. Sunderland, Sinauer Associates, 481 P.
- MACHADO, D.M. 2006. **Biologia Termal de *Cnemidophorus vacariensis* Feltrim & Lema, 2000 (Sauria, Teiidae) nos Campos de Cima da Serra do Rio Grande do Sul, Brasil**. 31p. Dissertação de Bacharelado – Curso Ciências Biológicas, Ênfase Ambiental, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- MARJORAM, P. & P. DONNELLY. 1994. Pairwise comparison of mitochondrial DNA sequences in subdivided populations and implication for early human evolution. **Genetics** 136: 673-683.

- MARQUES, A.A.B.; C.S. FONTANA; E. VÉLEZ; G.A. BENCKE; M. SCHNEIDER & R.E. REIS. 2002. **Lista das Espécies de Fauna Ameaçadas de Extinção no Rio Grande do Sul**. Decreto nº 41.672, de 11 de junho de 2002. Porto Alegre, FZB/MCT-PUCRS/PANGEA. 52 P. (Publicações Avulsas FZB, 11).
- MARTINS, M.R.C. & F.B. MOLINA. 2008. Répteis. *IN*: Machado, A.B.M.; Drummond, G.M. & A.P. Paglia (EDS.). **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. 1.ed. Brasília, DF : MMA; Belo Horizonte, MG : Fundação Biodiversitas. P. 326-377.
- MIKICH, S.B. & R.S. BÉRNILS. (EDS.). 2004. **Livro vermelho da fauna ameaçada do Estado do Paraná**. Curitiba, Instituto Ambiental do Paraná. 764 P.
- MORITZ, C. 1994. Defining “Evolutionary Significant Units” for conservation. *Tree* 9 (10): 373-375
- NIXON, K.C. (ED.). 2002. **WinClada v.1.00.08**. Ithaca, NY.
- OKAMOTO, T. & HIKIDA, T. 2009. Three genetic lineages of the Japanese skink *Plestiodon japonicus* (Scincidae, Squamata) and the genetic composition of their contact zones. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research** 47 (2): 181-188.
- ORTIZ-JAUREGUIZAR, E. & CLADERA, G.A. 2006. Paleoenvironmental evolution of southern South América during the Cenozoic. **Journal of Arid Environments** 66: 498-532.
- PERERA, A. & HARRIS, D.J. 2010. Genetic variability within the Oudri’s fan-footed gecko *Ptyodactylus oudrii* in North Africa assessed using mitochondrial and nuclear DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 54: 634-639.
- PETERS, J. A. & E.R. DONOSO-BARROS. 1970. **Catalogue of the Neotropical Squamata. Part II. Lizards and Amphisbaenians**. Smithsonian Institution Press, Washington, DC.
- PHILLIPS, S.J.; R.P. ANDERSON & R.E. SCHAPIRE. 2006. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. **Ecological Modelling** 190: 231-259.
- PILLAR, V. D. & F.L.F. de QUADROS. 1997. Grassland-forest boundaries in Southern Brazil. **Coenoses** 12: 119–126.
- POSADA, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic model averaging. **Molecular Biology and Evolution** 25: 1253-1256.
- POUGH, F.H.; R.M. ANDREWS; J.E. CADLE,; M.L. CRUMP,; A.H. SAVITZKY, & K.D. WELLS. 1998. **Herpetology**. Upper saddle River, New Jersey, Prentice Hall. XI + 577 P.

- POULAKAKIS, N.; LYMBERALIS, P.; VALAKOS, E.; PAFILIS, P.; ZOUROS, E. & MYLONAS, M. 2005. Phylogeography of Balkan wall lizard (*Podarcis taurica*) and its relatives inferred from mitochondrial DNA sequences. **Molecular Ecology** 14: 2433-2443.
- RATO, C., & D.J. HARRIS. 2008. Genetic variation within *Saurodactylus* and its phylogenetic relationships within the Gekkonoidea estimated from mitochondrial and nuclear DNA sequences. **Amphibia-Reptilia** 29: 25–34.
- REEDER, T. W. 1995. Phylogenetic relationships among phrynosomatid lizards as inferred from mitochondrial ribosomal DNA sequences: substitutional bias and informational contents of transitions relative to transversions. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 4: 203-222.
- REEDER, T.W., C.J. COLE & H.C. DESSAUER. 2002. Phylogenetic relationships of whiptail lizards of the genus *Cnemidophorus* (Squamata: Teiidae): a test of monophyly, reevaluation of karyotypic evolution, and review of hybrid origins. **American Museum Novitates**: 1-61.
- REZENDE-PINTO, F.M.; VERRASTRO, L.; ZANOTELLI, J.C. & BARATA, P.C.R. 2009. Reproductive biology and sexual dimorphism in *Cnemidophorus vacariensis* (Sauria, Teiidae) in the grasslands of the Araucaria Plateau, southern Brazil. **Iheringia, Série Zoologia** 99 (1): 82-91.
- RIDLEY, M. 2006. **Evolução**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed. P. 167-184.
- ROGERS, A.R. & HARPENDING, H., 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. **Molecular Biology and Evolution** 9: 552-569.
- RONQUIST, F. & J.P. HUELSENBECK. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics** 19:1572-74.
- ROZAS, J.; SÁNCHEZ-DELBARRIO, J.C; MESSEGUER, X. & R. ROZAS. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. **Bioinformatics** 19: 2496-2497.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. & T. MANIATIS. 1989. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor.
- SBH. 2009. **Lista de espécies de répteis do Brasil. Sociedade Brasileira de Herpetologia (SBH)**. Disponível em: <http://www2.sbherpetologia.org.br/checklist/repteis.htm>. Acesso em 03/03/2010.
- SCHOSSLER, M. 2006. **Dieta de *Cnemidophorus vacariensis* FELTRIM & LEMA, 2000, (SQUAMATA, TEIIDAE) em uma população dos Campos do Planalto das Araucárias do Rio Grande do Sul**. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, UFRGS.

- SCHWARZ, G. 1978. **Annals of Statistics** 6: 461-464.
- STAHNKE, L.F., G.E.F. SILVA, R.S. REGULY & I.F. MACHADO. 2006. Novo registro de *Cnemidophorus vacariensis* para o estado do Rio Grande do Sul, Brasil (Sauria, Teiidae). **Biociências** 14 (1): 91-92.
- TAJIMA, F. 1989. The effect of change in population size on DNA polymorphism. **Genetics** 123: 597-601.
- TAMURA, K., DUDLEY, J., NEI, M. & S. KUMAR. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution** 24: 1596-1599.
- TAYLOR, L.H.; WALKER, J.M.; CORDES, J.E. & MANNING, G.J. 2005. Application of the Evolutionary Species Concept to Parthenogenetic Entities: Comparison of Postformational Divergences in Two Clones of *Aspidoscelis tessellata* and between *Aspidoscelis cozumela* and *Aspidoscelis maslini* (Squamata: Teiidae). **Journal of Herpetology** 39 (2): 266-277.
- TECHNELYSIUM PTY LTD. 2005. Disponível em www.technelysium.com.au; acesso em dezembro de 2008.
- TER BRAAK, C.J.F. 1988. **CANOCO – A FORTRAN program of canonical community ordination by (partial) (detrended) (canonical) correspondence analysis, principal components analysis and redundancy analysis v.2.1**. Wageningen, Technical report: LWA-88-02, Statistics Department Wageningen.
- TER BRAAK, C.J.F. & P. SMILAUER. 2002. **CANOCO reference manual and CanoDraw for Windows user's guide: software for canonical community ordination (v.4.5)**. Microcomputer Power, Ithaca, NY.
- VICTORIANO, P.F.; ORTIZ, J.C.; BENAVIDES, E.; ADAMS, B.J. & SITES, J.W. 2008. Comparative phylogeography of codistributed species of Chilean *Liolaemus* (Squamata: Tropiduridae) from the central-southern Andean range. **Molecular Ecology** 17: 2397-2416.
- VIGILANT, L.; R. PENNINGTON; H. HARPENDING; T.D. KOCHER & A.C. WILSON. 1989. Mitochondrial DNA sequences in single hairs from a southern African population. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 86: 9350-9354.
- WERNECK, F.P; GIUGLIANO, L.G.; COLLEVATTI, R.G. & G.R. COLLI. 2009. Phylogeny, biogeography and evolution of clutch size in South American lizards of the genus *Kentropyx* (Squamata: Teiidae). **Molecular Evolution** 18: 262-278.
- WRIGHT, J.W. 1993. Evolution of whiptail lizards (Genus *Cnemidophorus*). *IN*: WRIGHT, J.W. & L.J. VITT (EDS.). **Biology of whiptail lizards (Genus *Cnemidophorus*)**. Oklahoma Museum of Natural History, Norman, Oklahoma. P. 27-81.

- WRIGHT, S. 1921. Systems of mating. **Genetics** 6: 111-178.
- WRIGHT, S. 1978. **Evolution and the Genetics of Population. Vol. 3. Experimental Results and Evolutionary Deductions.** University of Chicago Press.
- YOKE, M.M.; MORANDO, M.; AVILA, L.J. & SITES JR., J.W. 2006. Phylogeography and genetic structure in the *Cnemidophorus longicauda* complex (Squamata, Teiidae). **Herpetologica** 62 (4): 420-434.
- ZILLER, S.R. & F. GALVÃO. 2001. A degradação da estepe gramíneo-lenhosa no Paraná por contaminação biológica de *Pinus elliotti* e *P. taeda*. **Revista Floresta** 32 (1): 42-47.
- ZWICKL, D. J. 2006. **Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion.** Tese de doutorado. Universidade do Texas, Austin.

ANEXOS

ANEXO I

Lista do material examinado

Cnemidophorus vacariensis (exemplares) – Brasil: Estado do Paraná, Município de Candói (UFRGS 5074, UFRGS 5075, UFRGS 5078, UFRGS 5079, UFRGS 5080, UFRGS 5081, UFRGS 5099, UFRGS 5100, UFRGS 5101); Estado do Rio Grande do Sul, Município de Bom Jesus (UFRGS 4561, UFRGS 4562, UFRGS 4563, UFRGS 4564, UFRGS 4565, UFRGS 4566, UFRGS 4567, UFRGS 4780, UFRGS 4781, UFRGS 4782, UFRGS 4783, UFRGS 4784, UFRGS 4785, UFRGS 4886, UFRGS 4887, UFRGS 4888, UFRGS 4889, UFRGS 4890, UFRGS 4891, UFRGS 4892, UFRGS 4893, UFRGS 4894, UFRGS 4895); Jaquirana (UFRGS 4919, UFRGS 4920, UFRGS 5271, UFRGS 5272, UFRGS 5273, UFRGS 5274, UFRGS 5275); São Francisco de Paula, Vila Rural Cazuza Ferreira, Localidade Campestre do Tigre (UFRGS 4809, UFRGS 4810, UFRGS 4811, UFRGS 4812, UFRGS 4813, UFRGS 4814, UFRGS 4815); São Francisco de Paula, Vila Rural Cazuza Ferreira, Localidade Pedra Lisa (UFRGS 4816, UFRGS 4817, UFRGS 4819, UFRGS 4820, UFRGS 4822, UFRGS 4823); Vacaria (UFRGS 4720, UFRGS 4721, UFRGS 4722, UFRGS 4723, UFRGS 4724, UFRGS 4725, MCP 10465 (parátipo), MCP 10466 (holótipo), MCP 10467 (parátipo), MCP 10468 (parátipos)); Estado de Santa Catarina, Município de Campo Belo do Sul (UFRGS 4860, UFRGS 4861, UFRGS 4862, UFRGS 4863, UFRGS 4864, UFRGS 4865, UFRGS 4866, UFRGS 4867, UFRGS 4868, UFRGS 4869, UFRGS 4870, UFRGS 4871, UFRGS 4872, UFRGS 4873, UFRGS 4874, UFRGS 4875); Capão Alto (UFRGS 4839, UFRGS 4840, UFRGS 4841, UFRGS 4842, UFRGS 4843, UFRGS 4844, UFRGS 4845, UFRGS 4846, UFRGS 4847, UFRGS 4848, UFRGS 4849, UFRGS 4850, UFRGS 4851, UFRGS 4852, UFRGS 4853, UFRGS 4854); São Joaquim (UFRGS 5196, UFRGS 5197, UFRGS 5198, UFRGS 5199, UFRGS 5200, UFRGS 5201, UFRGS 5202).

Cnemidophorus vacariensis (material genético) – Brasil: Estado do Paraná, Município de Candói (UFRGST 588, UFRGST 589, UFRGST 611, UFRGST 612, UFRGST 613, UFRGST 614, UFRGST 630, UFRGST 631, UFRGST 632); Estado do Rio Grande do Sul, Município de Bom Jesus (UFRGST 125, UFRGST 126, UFRGST 128, UFRGST 130, UFRGST 132, UFRGST 133, UFRGST 135, UFRGST 136, UFRGST 138, UFRGST 188, UFRGST 189, UFRGST 190, UFRGST 191, UFRGST 192, UFRGST 193, UFRGST 194, UFRGST 195, UFRGST 196, UFRGST 197, UFRGST 198, UFRGST 199, UFRGST 200, UFRGST 201, UFRGST 202); Jaquirana (UFRGST 313, UFRGST 314, UFRGST 1124, UFRGST 1125, UFRGST 1126, UFRGST 1127, UFRGST 1128); São Francisco de Paula, Vila Rural Cazuza Ferreira, Localidade Campestre

do Tigre (UFRGST 139, UFRGST 140, UFRGST 141, UFRGST 142, UFRGST 143, UFRGST 144, UFRGST 145); São Francisco de Paula, Vila Rural Cazuza Ferreira, Localidade Pedra Lisa (UFRGST 146, UFRGST 147, UFRGST 148, UFRGST 149, UFRGST 150, UFRGST 151, UFRGST 152, UFRGST 153); Vacaria (UFRGST 124, UFRGST 127, UFRGST 129, UFRGST 131, UFRGST 134, UFRGST 137); Estado de Santa Catarina, Município de Campo Belo do Sul (UFRGST 154, UFRGST 155, UFRGST 156, UFRGST 157, UFRGST 158, UFRGST 159, UFRGST 160, UFRGST 161, UFRGST 162, UFRGST 163, UFRGST 164, UFRGST 165, UFRGST 166, UFRGST 167, UFRGST 168, UFRGST 169, UFRGST 170, UFRGST 171); Capão Alto (UFRGST 172, UFRGST 173, UFRGST 174, UFRGST 175, UFRGST 176, UFRGST 177, UFRGST 178, UFRGST 179, UFRGST 180, UFRGST 181, UFRGST 182, UFRGST 183, UFRGST 184, UFRGST 185, UFRGST 186, UFRGST 187); São Joaquim (UFRGST 816, UFRGST 817, UFRGST 818, UFRGST 819, UFRGST 820, UFRGST 821, UFRGST 822).

ANEXO II

Protocolo de extração de DNA com fenol-clorofórmio (adaptado de SAMBROOK, 1989)

1. Picar cerca de 20 mg de tecido.
2. Adicionar 500 μ L de tampão de lise (STE).
3. Adicionar 40 μ L de proteinase K (20 mg/mL).
4. Incubar com agitação a 55°C e 120 RPM por cerca de 1 hora ou até digerir o tecido.
5. Adicionar 100 μ L de acetato de amônio 3M.
6. Adicionar 1 volume de fenol-clorofórmio.
7. Misturar por inversão.
8. Centrifugar por 15-30 minutos a 13.000 RPM.
9. Transferir o sobrenadante para um tubo novo.
10. Adicionar 1 volume de clorofórmio (este vem junto com álcool isoamílico).
11. Misturar por inversão.
12. Centrifugar por 15-20 minutos a 13.000 RPM.
13. Transferir o sobrenadante para um tubo novo.
14. Adicionar 100 μ L de acetato de amônio 3M.
15. Adicionar 1 volume de isopropanol gelado ou álcool gelado.
16. Deixar overnight a -20°C para precipitar.
17. Centrifugar por 30 minutos a 13.000.
18. Descartar o sobrenadante.
19. Lavar o pellet com 1 ml de etanol 70%.
20. Centrifugar 20 minutos a 13.000.
21. Descartar o sobrenadante.
22. Deixar secar na estufa a 55°C ou a temperatura ambiente até secar.
23. Ressuspender em TE 1x ou água. A quantidade de TE (50-150 μ L) depende de como estava a amostra no início.
24. Deixar eluindo em banho-maria a 55°C por 1 hora ou na bancada overnight.

ANEXO III

Tabela 1. Programa para amplificação (*Polimerase Chain Reaction*, PCR) dos segmentos mitocondriais 12S e 16S.

<i>Ciclo</i>	<i>Tempo</i>	<i>Temperatura (°C)</i>
1	5 minutos	94
2	30 segundos	94
3	30 segundos	50
4	45 segundos	72
5	Repete 30 x o ciclo 2	
6	7 minutos	72
7	1 hora	4

ANEXO IV

Quadro 1. Indivíduos de *Cnemidophorus vacariensis* sequenciados e analisados para os genes 12S, 16S e o conjunto concatenado (12S + 16S) com seu número de tombo da Coleção Científica (UFRGS) e na Coleção Científica de Tecidos (UFRGST) do Laboratório de Herpetologia, Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O código refere-se aos nomes usados nas análises filogenéticas.

<i>UFRGS</i>	<i>UFRGST</i>	<i>CÓDIGO</i>	<i>12S</i>	<i>16S</i>	<i>12S + 16S</i>
4561	-	Vac01(BJ RS)			
4566	-	Vac02(BJ RS)			
4562	-	Vac03(BJ RS)			
4564	-	Vac04(BJ RS)			
4567	-	Vac05(BJ RS)			
4565	-	Vac06(BJ RS)			
4563	-	Cvac07(BJ RS)			
4783	125	Vac125(BJ RS)			
4784	126	Cvac126(BJ RS)			
-	128	Cvac128(BJ RS)			
4780	130	Cvac130(BJ RS)			
4781	132	Cvac132(BJ RS)			
4782	133	Cvac133(BJ RS)			
-	135	Cvac135(BJ RS)			
-	136	Cvac136(BJ RS)			
4785	138	Cvac138(BJ RS)			
4882	189	Vac189(BJ RS)			
4883	190	Vac190(BJ RS)			
4884	191	Cvac191(BJ RS)			
4886	193	Cvac193(BJ RS)			
4724	124	Vac124(VAC RS)			
4720	127	Vac127(VAC RS)			
4723	129	Vac129(VAC RS)			
4721	131	Vac131(VAC RS)			
4722	134	Vac134(VAC RS)			
4725	137	Cvac137(VAC RS)			
4809	139	Cvac139(SF CT RS)			
4810	140	Vac140(SF CT RS)			
4811	141	Cvac141(SF CT RS)			
4812	142	Vac142(SF CT RS)			
4813	143	Cvac143(SF CT RS)			
4814	144	Cvac144(SF CT RS)			
4815	145	Vac145(SF CT RS)			
4817	147	Cvac147(SF PL RS)			
4819	149	Vac149(SF PL RS)			
4820	150	Cvac150(SF PL RS)			
4822	152	Vac152(SF PL RS)			
4823	153	Vac153(SF PL RS)			
4860	154	Cvac154(CBS SC)			
4861	155	Vac155(CBS SC)			
4862	156	Vac156(CBS SC)			
4864	158	Vac158(CBS SC)			
4865	159	Vac159(CBS SC)			

<i>UFRGS</i>	<i>UFRGST</i>	<i>CÓDIGO</i>	<i>12S</i>	<i>16S</i>	<i>12S + 16S</i>
4866	160	Vac160(CBS SC)			
4868	162	Cvac162(CBS SC)			
4868	163	Cvac163(CBS SC)			
4869	164	Cvac164(CBS SC)			
4871	166	Cvac166(CBS SC)			
4872	167	Cvac167(CBS SC)			
4873	168	Cvac168(CBS SC)			
4874	169	Cvac169(CBS SC)			
4870	170	Cvac170(CBS SC)			
4875	171	Cvac171(CBS SC)			
4839	172	Vac172(CA SC)			
4840	173	Vac173(CA SC)			
4841	174	Vac174(CA SC)			
4842	175	Cvac175(CA SC)			
4844	177	Vac177(CA SC)			
4845	178	Vac178(CA RS)			
4846	179	Vac179(CA SC)			
4847	180	Vac180(CA SC)			
4849	182	Cvac182(CA SC)			
4850	183	Cvac183(CA SC)			
4851	184	Cvac184(CA SC)			
4853	186	Cvac186(CA SC)			
4919	313	Cvac313(JAQ RS)			
4920	314	Cvac314(JAQ RS)			
5272	1125	Cvac1125(JAQ RS)			
5273	1126	Cvac1126(JAQ RS)			
5074	588	Cvac588(CAN PR)			
5079	612	Cvac612(CAN PR)			
5100	631	Cvac631(CAN PR)			
5101	632	Cvac632(CAN PR)			
5196	816	Cvac816(SJO SC)			
5197	817	Cvac817(SJO SC)			
5199	819	Cvac819(SJO SC)			
5200	820	Cvac820(SJO SC)			
5202	822	Cvac822(SJO SC)			

Legenda: as células em cinza indicam que o exemplar foi analisado.