

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA**  
**MOLECULAR**

**Base genética do polimorfismo da coloração em espécies de *Liolaemus* (Iguania: Liolaemidae): uma análise do gene receptor de melanocortina-1 (*MC1R*)**

**JOSMAEL CORSO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS, como requisito parcial para obtenção de grau **Mestre em Genética e Biologia Molecular.**

**Orientador: Prof. Dr. Thales R. O. de Freitas**

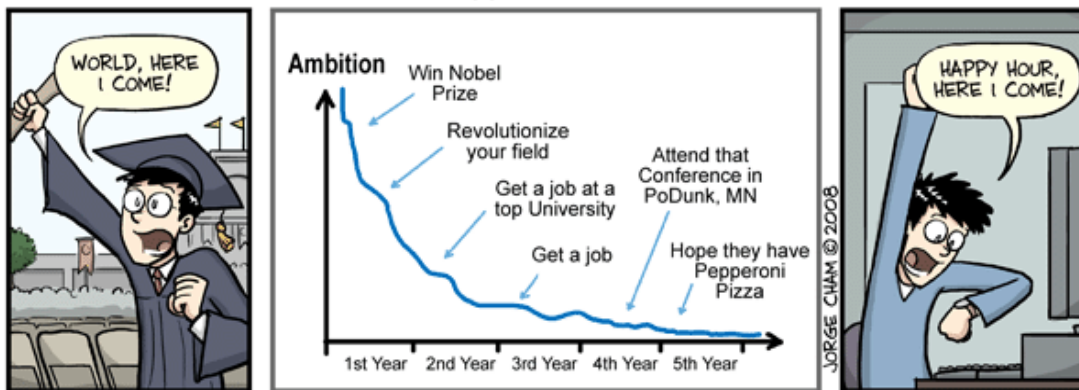
Porto Alegre, Março de 2011.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de  
Citogenética e Evolução do Departamento de Genética  
do Instituto de Biociências da Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul.

## Dedicatória

Aos colegas e amigos do laboratório.

### YOUR LIFE AMBITION - What Happened??



## AGRADECIMENTOS

A todas as pessoas com as quais foi possível a realização deste trabalho, enumero muitas delas, mas crente que haverei de esquecer aquelas que de algum modo contribuíram mesmo nas formas mais sutis mas essenciais à minha formação;

Ao Laboratório de Citogenética e Evolução pela infraestrutura;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular pelo conhecimento transmitido e por vezes compartilhado;

Ao orientador Prof. Thales de Freitas pela proposta e liberdade no desenvolvimento desse trabalho;

À Gislene Lopes devo agradecer não apenas ao papel de colaboração, mas sim muitas vezes no de orientação e auxílio permanente no desenvolvimento do trabalho;

À Carolina da Silva e sua orientadora pela colaboração fornecendo meios que este trabalho fosse possível;

À Lúcia, Ellen e ao Elmo por toda ajuda administrativa que sempre atendem a todos os alunos de modo além da eficiência;

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Citogenética e Evolução pelos auxílios na bancada, nas análises e críticas sempre construtivas que promovem a formação mútua: Pedro, Paula, Darlise, Leonardo, Camila, Gabi, Gabriela, Simone, Claiton, Carla, Lívia, Rodrigo, Tati, Fabrício e a também aqueles que eu esqueci mas que ao lerem pensarem “putz... eu não to aqui!”;

Aos companheiros da sala 107, Jorge e José, por incontáveis momentos de risos, o Jorge por achar que todo lugar é o dele, o José por todo dia nos presentear com alguma história, que no mínimo era hilária;

Aos amigos que partilharam diversos momentos de descontração, brincadeiras e conversas que me fazem sentir uma pessoa melhor a cada dia;

À minha família por todo incondicional amor e apoio, que sem esses acredito que não seria possível ter dado passos a frente.

## SUMÁRIO

1. RESUMO.....	06
2. ABSTRACT.....	06
3. INTRODUÇÃO .....	08
3.1. Considerações Gerais .....	08
3.2. O gene receptor de melanocortina-1 ( <i>MC1R</i> ).....	12
3.3. Modelo de estudo: gênero <i>Liolaemus</i> .....	14
3.4. Área de estudo .....	20
4. OBJETIVOS .....	22
5. ARTIGO.....	23
6. DISCUSSÃO GERAL.....	55
6.1. Polimorfismos <i>MC1R</i> em répteis.....	55
6.2. Localização dos polimorfismos <i>MC1R</i> em vertebrados.....	56
6.3. Mutação responsável por fenótipo não segue padrão.....	58
6.4. A influência de outros fatores sobre a coloração.....	59
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	61

## 1. RESUMO

A elucidação da base molecular da variação fenotípica adaptativa compreende um dos principais objetivos da biologia evolutiva. Na última década, o gene do receptor de melanocortina-1 (*MC1R*) regulador da síntese de melanina tem sido foco de diversos estudos sobre a coloração do corpo nos vertebrados. Analisou-se a variação deste gene em duas espécies do gênero *Liolaemus* que apresentam colorações distintas e crípticas. Os polimorfismos genéticos encontrados nas espécies não foram associados com o padrão de coloração corporal. Em *L. arambarensis* foram observadas cinco substituições sinônimas, nenhuma delas era estritamente associada com a variação de coloração. Da mesma forma, a análise comparativa mostrou que as sequências de *Liolaemus* foram monomórficas em posições de aminoácidos funcionalmente importantes na coloração do corpo de outras espécies de répteis. Contrariamente a outros grupos taxonômicos, tais resultados demonstram que não há um padrão único de sítios responsáveis por mudanças na coloração do corpo nesse grupo. Estes resultados permitem inferir que outros genes e/ou processos de regulação devem agir sobre a coloração, bem como ação de fatores não-genéticos.

## 2. ABSTRACT

The molecular basis of adaptive phenotypic variation comprises a major goal of evolutionary biology. In the last decade the melanocortin-1 receptor gene (*MC1R*), which regulates the synthesis of melanin, has been the focus of various studies on the body coloration in vertebrates. We analyzed the variation of this gene in two species of sand lizards of the genus *Liolaemus*, both with distinct and cryptic color. The polymorphisms

found were not associated with the variation of body color. In *L. arambarensis* were observed five synonymous substitutions, none of which were strictly associated with colour type. Similarly, comparative analysis showed that the *Liolaemus* sequences were monomorphic in amino acid sites functionally important in the body coloration of other reptiles. Contrary to others taxa, these results suggest that there is not a unique pattern of sites accounting for changes in body coloration. It is possible that other genes and/or regulation process besides *MC1R* maybe influencing on the coloration, as well as action the of non-genetic factors.

### 3. INTRODUÇÃO

#### 3.1. Considerações Gerais

A elucidação da base molecular da variação fenotípica, um dos principais objetivos da biologia evolutiva, tem despertado interesse dos pesquisadores há muito tempo. Entretanto, exceto nos últimos anos, há poucos trabalhos que relacionam genótipos a fenótipos, devido principalmente a dificuldade em localizar um gene (ou genes) responsável por mudanças que atue diretamente sobre as características fenotípicas (Hoekstra, 2006). O sistema de pigmentação é um fenótipo promissor para este tipo de estudo por explorar a conexão entre genótipo e fenótipo. Forças seletivas como cripsis, aposematismo, termorregulação e seleção sexual direcionam a variação do padrão de coloração (Hoekstra, 2006). Assim, fenótipos com variação na pigmentação em populações naturais apresentam uma oportunidade para estudo da base genética da diversidade fenotípica e das mudanças evolutivas. Recentemente tem sido possível ir além da observação dos fenótipos e explorar a evolução dessa diversidade em nível genético e molecular (Protas e Patel, 2008). O estudo do polimorfismo de coloração corporal tem se mostrado eficiente, principalmente após a descoberta do gene receptor de melanocortina-1 (*MC1R*) (Figura 1) (Mountjoy *et al.*, 1992; Eizirik *et al.*, 2003; Mundy, 2005). Alterações na sequência codificante do correspondente gene são conhecidas por apresentarem forte associação com a variação da coloração de pelagem e plumagem em espécies de mamíferos e aves, respectivamente (Mundy, 2005).



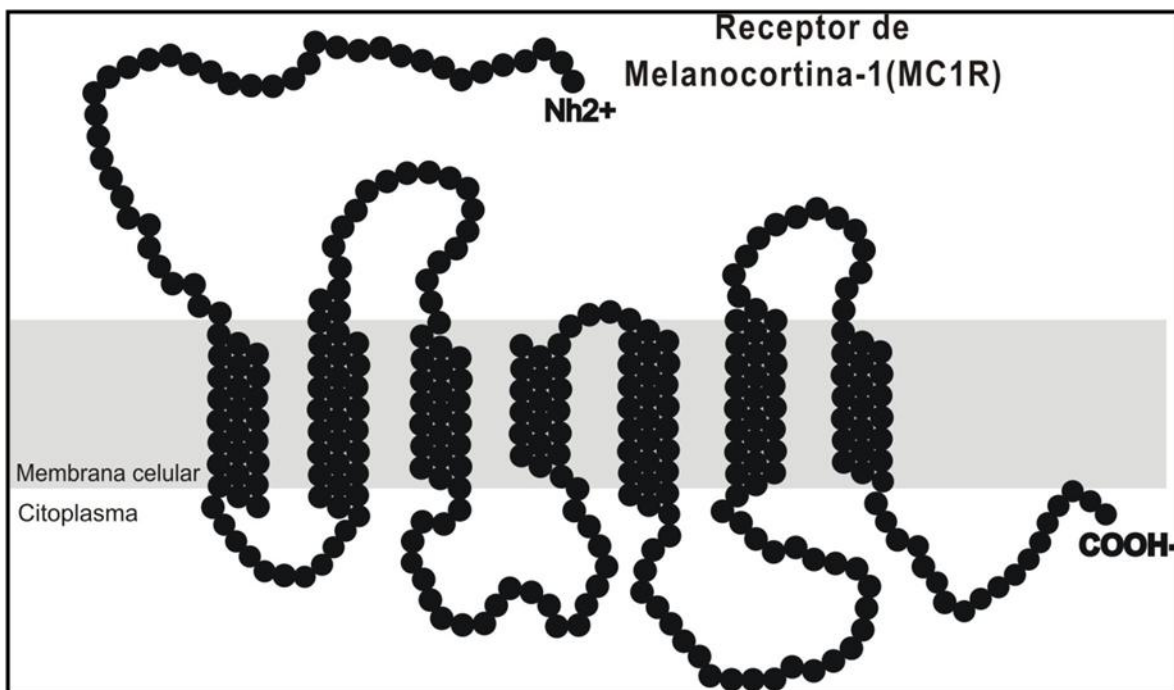


Figura 1. Representação bidimensional da proteína codificada pelo gene *MC1R*. (Modificado de Majerus e Mundy, 2003).

Em pouco mais de uma década, vários trabalhos revelaram espécies animais com determinadas mutações no gene *MC1R* que causam mudanças na coloração clara/escuro ao longo do corpo ou da pelagem (e.g., Tabela 1). Entretanto, paralelamente têm surgido diversos casos em que o gene *MC1R* parece não estar envolvido nas diferenças de coloração (Tabela 2).

Tabela 1. Relação de espécies animais com associação entre alterações no gene *MC1R* e coloração corporal.

Espécies: nome comum, científico	Referência
Gado ( <i>Bos taurus</i> )	Klungland <i>et al.</i> , 1995
Rato ( <i>Mus musculus</i> )	Barsh, 1996
Cavalo ( <i>Equus caballus</i> )	Marklund <i>et al.</i> , 1996

Tabela 1. Relação de espécies animais com associação entre alterações no gene *MC1R* e coloração corporal.

Galinha ( <i>Gallus gallus</i> )	Takeuchi <i>et al.</i> , 1996
Raposa vermelha ( <i>Vulpes vulpes</i> )	Vage <i>et al.</i> , 1997
Suíno ( <i>Sus scrofa</i> )	Kijas <i>et al.</i> , 1998; Fang <i>et al.</i> , 2009
Ovinos ( <i>Ovis Áries</i> )	Vage <i>et al.</i> , 1999
Cão ( <i>Canis lupus familiaris</i> )	Newton <i>et al.</i> , 2000
Urso Preto ( <i>Ursus americanus</i> )	Ritland <i>et al.</i> , 2001
Bananaquit ( <i>Coereba flaveolata</i> )	Theron <i>et al.</i> , 2001
Onça ( <i>Panthera onça</i> )	Eizirik <i>et al.</i> , 2003
Jaguarundi ( <i>Puma yagouaroundi</i> )	Eizirik <i>et al.</i> , 2003
Algumas populações de rock pocket mouse, ( <i>Chaetodipus intermedius</i> )	Nachman <i>et al.</i> , 2003
Ganso ( <i>Anser c. caerulescens</i> )	Mundy <i>et al.</i> , 2004
Moleiros ( <i>Stercorarius parasiticus</i> )	Mundy <i>et al.</i> , 2004
Fairy-wrens ( <i>Malurus leucopterus</i> )	Doucet <i>et al.</i> , 2004
Little striped whiptail ( <i>Aspidoscelis inornata</i> )	Rosenblum <i>et al.</i> , 2004
Lesser earless lizard ( <i>Holbrookia maculate</i> )	Rosenblum <i>et al.</i> , 2004
Eastern fence lizard ( <i>Sceloporus undulates</i> )	Rosenblum <i>et al.</i> , 2004
Atobá-de-patas-vermelhas ( <i>Sula sula</i> )	Baião <i>et al.</i> , 2007
Carneiro de Dall ( <i>Ovis dalli</i> )	Loehr <i>et al.</i> , 2008
Peixe-cego ( <i>Astyanax mexicanus</i> )	Gross <i>et al.</i> , 2009

Tabela 2. Relação de espécies animais em que **não** se encontrou relação entre alterações no gene *MC1R* e coloração corporal

Espécies: nome comum, científico	Referência
Algumas populações de rock pocket mouse ( <i>Chaetodipus intermedius</i> )	Hoekstra and Nachman, 2003

Tabela 2. Relação de espécies animais em que **não** se encontrou relação entre alterações no gene *MC1R* e coloração corporal

Diversos primatas (60 espécies)	Mundy and Kelly, 2003
Diversas felosas ( <i>Phylloscopus</i> )	MacDougall-Shackleton <i>et al.</i> , 2003
Desert horned lizard ( <i>Phrynosoma platyrhinos</i> )	Rosenblum <i>et al.</i> , 2004
Common side-blotched lizard ( <i>Uta stansburiana</i> )	Rosenblum <i>et al.</i> , 2004
Common gartersnake ( <i>Thamnophis sirtalis</i> )	Rosenblum <i>et al.</i> , 2004
California legless lizard ( <i>Anniella pulchra</i> )	Rosenblum <i>et al.</i> , 2004
Mustelídeos (Mustelidae)	Hosoda <i>et al.</i> , 2005
Pocket gophers ( <i>Thomomys bottae</i> )	Wlasiuk and Nachman, 2007
Uirapuru-de-chapéu-azul ( <i>Lepidothrix coronate</i> )	Chevireon <i>et al.</i> , 2006
Gênero <i>Macaca</i>	Nakayama <i>et al.</i> , 2008
Lobo- cinzento ( <i>Canis lupus</i> )	Anderson <i>et al.</i> , 2009

Em répteis é comum encontrar variações da coloração dorsal ao longo da distribuição geográficas. Em alguns casos, a variação da coloração dorsal coincide com o substrato que as espécies habitam, sugerindo atuação de pressões seletivas. Também, a variação da cor parece estar associada com diferenças na temperatura ambiental (Rosenblum *et al.*, 2004). Propõe-se que a variação da coloração age na regulação da temperatura em uma variedade de espécies ectotérmicas (Bittner *et al.*, 2002). Os avanços na compreensão da base genética de pigmentação em outros vertebrados fornecem meios para investigar os processos responsáveis pela variação da coloração no grupo de répteis (Rosenblum *et al.*, 2004).

### 3.2. O Gene Receptor de Melanocortina-1 (*MC1R*)

A proteína codificada pelo gene *MC1R* (receptor de melanocortina-1) é parte da superfamília de receptores acoplados à proteína G (GPCR – G protein-coupled receptor). Compreende um domínio N-terminal, sete domínios transmembrana e um domínio carboxi-terminal (Figura 1)(Gross *et al.*, 2009). O gene *MC1R* é expresso em melanócitos (melanóforos) de desenvolvimento de penas e pêlos, e executa o controle da síntese de melanina (Mundy, 2005). A compreensão do funcionamento do processo de regulação pigmentar em répteis é deficiente em pesquisas, entretanto, o processo é considerado similar ao mecanismo presente em aves e mamíferos. Nos mamíferos, a melanina é produzida em células especializadas conhecidas como melanócitos, e havendo dois tipos básicos de pigmentos: eumelanina (marrom escuro ou preta) e feomelanina (creme claro, amarelo ou vermelho) (Takeuchi *et al.*, 1996; Wlasiuk e Nachman, 2007). Intermedia o sinal de transdução do hormônio estimulante melanóforo ( $\alpha$ -MSH) e da proteína sinalizadora *agouti* (ASIP). Ao se ligar ao receptor *MC1R*,  $\alpha$ -MSH aumenta a produção de eumelanina em relação à feomelanina pela elevação do nível intracelular de AMP cíclico (cAMP) ativando a via de síntese de eumelanina. O *agouti* é competidor com  $\alpha$ -MSH pela ligação ao receptor, diminuindo o nível de cAMP e a produção de eumelanina e, em oposto elevando a produção de feomelanina (Figura 2; Hoekstra, 2006; Nakayama *et al.*, 2008). Estudos com vertebrados domésticos demonstraram que determinados polimorfismos de *MC1R* foram associados ao aumento da produção de eumelanina, ou seja, predominância da coloração escura, em oposto, também há polimorfismos que favorecem a coloração clara, com a produção aumentada de feomelanina (Theron *et al.*, 2001; Eizirik *et al.*, 2003; Mundy, 2005).

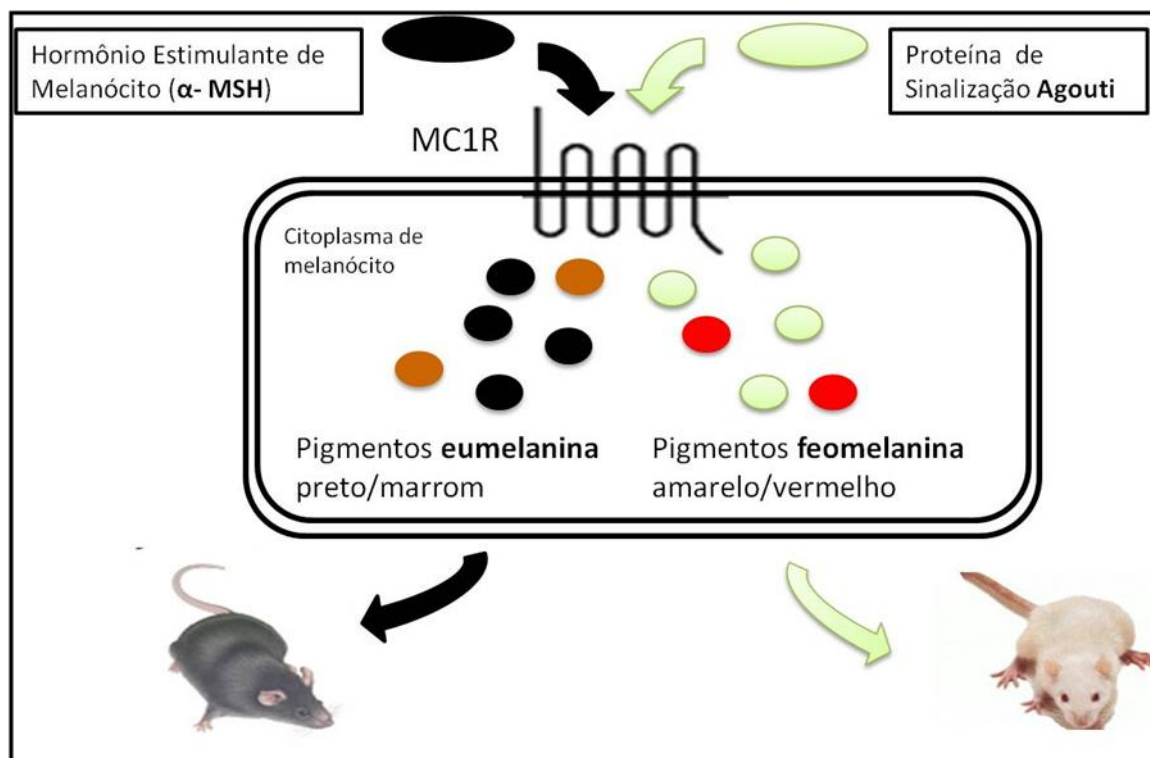


Figura 2. Representação simplificada da síntese de pigmentos eumelanina e feomelanina em célula de melanócito.

Embora a morfologia da célula produtora de pigmento de répteis seja diferente daquelas de aves e mamíferos a função da melanina é notavelmente conservada. Répteis possuem três camadas de três tipos diferentes de células de produção de pigmento (cromatóforos): xantóforos, iridóforos e melanóforos (Rosenblum, 2004). Sendo que apenas esse último tipo celular produz melanina, as demais células são responsáveis por outros pigmentos cuja síntese e regulação são praticamente desconhecidas. A coloração escura da pele é principalmente um resultado da produção/dispersão de pigmento pelos melanóforos (Trullas *et al.*, 2007). Em lagartos que sofrem mudanças de coloração em curto prazo (ou seja, flexibilidade fenotípica), grânulos de melanina (melanosomos) agregam ou dispersam dentro dos melanóforos resultando em clareamento ou escurecimento da pele, respectivamente (Trullas *et al.*, 2007). O movimento intracelular

dos pigmentos pode ocorrer em resposta a um ou mais fatores: a) resposta a neurotransmissores que elevam os níveis de hormônios (hormônio estimulante melanóforo  $\alpha$ -MSH e de catecolaminas, como isoproterenol); b) luminosidade (Sherbrooke *et al.*, 1994; Trullas *et al.*, 2007). Além disso, as alterações na cor que ocorrem durante o desenvolvimento do organismo – ontogenia - podem causar aumento ou diminuição da produção (em vez da movimentação) de pigmentos melanina em resposta a longa exposição a sinais ambientais, como a temperatura (Garcia *et al.*, 2003). Embora os estímulos ambientais possam contribuir para variação da coloração fisiológica e ontogenética, sugere-se que a variação entre e dentro de espécies são geneticamente controladas. Essa informação tem recebido maior suporte com a compreensão da base genética do melanismo a partir da análise molecular. Em aves e mamíferos, o melanismo é muitas vezes mediado por substituições de aminoácidos na proteína MC1R. Em répteis há um número restrito de estudos desenvolvidos que fornecem informações sobre a evolução molecular do gene MC1R e a função do gene na variação adaptativa da coloração (Rosenblum, 2004; 2009).

### 3.3. Modelo de estudo: gênero *Liolaemus*

O gênero *Liolaemus* (Liolaemidae) inclui lagartos de pequeno e médio porte, e possui cerca de 225 espécies descritas, constituindo o maior número de espécies do grupo Squamata do sul da América do Sul (Avila *et al.*, 2010; Etheridge, 2000). Está distribuído em grande variedade de habitats, desde o nível do mar até 5000 metros de altitude, em extensas áreas de areia eólica, incluindo praias arenosas do Chile, Argentina, Uruguai e o

sul do Brasil, e areias planas e sistemas de dunas dispersos por todo o interior da Argentina e Chile (Figura 3) (Etheridge, 2000; Verrastro *et al.*, 2003). Esses répteis exibem um extenso espectro de adaptações morfológicas e comportamentais que facilitam a vida por baixo e na superfície de areia, assim como focinho em forma de cunha, especialização do esterno para respiração embaixo da areia, mergulho rápido como escape e refúgio diurno, redução do dimorfismo sexual e coloração críptica (Etheridge, 2000; Silva e Verrastro, 2007). *Liolaemus* caracteriza-se por uma grande versatilidade ecológica, constituindo-se em um gênero com diversos tipos morfológicos, padrão de coloração variável, geralmente críptico (Donoso-Barros 1966 *in* Silva, 2006). No sul do Brasil ocorrem duas espécies: *Liolaemus arambarensis* Verrastro *et al.*, 2003 e *Liolaemus occipitalis* Boulenger, 1885.

*L. occipitalis* ocorre na primeira linha de dunas arenosas no extremo sul do Brasil, nos Estados do Rio Grande do Sul e sul de Santa Catarina (Figura 4-5) (Verrastro e Krause, 1999), estendendo-se até a costa uruguaia (desde Barra Del Chuy até a margem esquerda do Arroio Valizas) (Verrastro *et al.*, 2006)

*L. arambarensis* habita ambientes de restingas da Laguna dos Patos, com ocorrência conhecida desde Itapuã (Município de Viamão) até São Lourenço do Sul, sendo endêmico destes locais (Figura 6-7) (Verrastro *et al.*, 2003).

A espécie *Liolaemus occipitalis* apresenta coloração clara e vive em um substrato arenoso claro (fenótipo claro), enquanto *L. arambarensis* apresenta coloração corporal escura (fenótipo escuro), e ocupa dunas de interior de continente, que possuem substrato arenoso mais escuro, sendo portando, também críptica. Ambas espécies foram selecionadas para realização desse estudo por apresentarem coloração críptica ao seu habitat bem como pela sua proximidade filogenética (Figura 8) (Verrastro *et al.*, 2003).

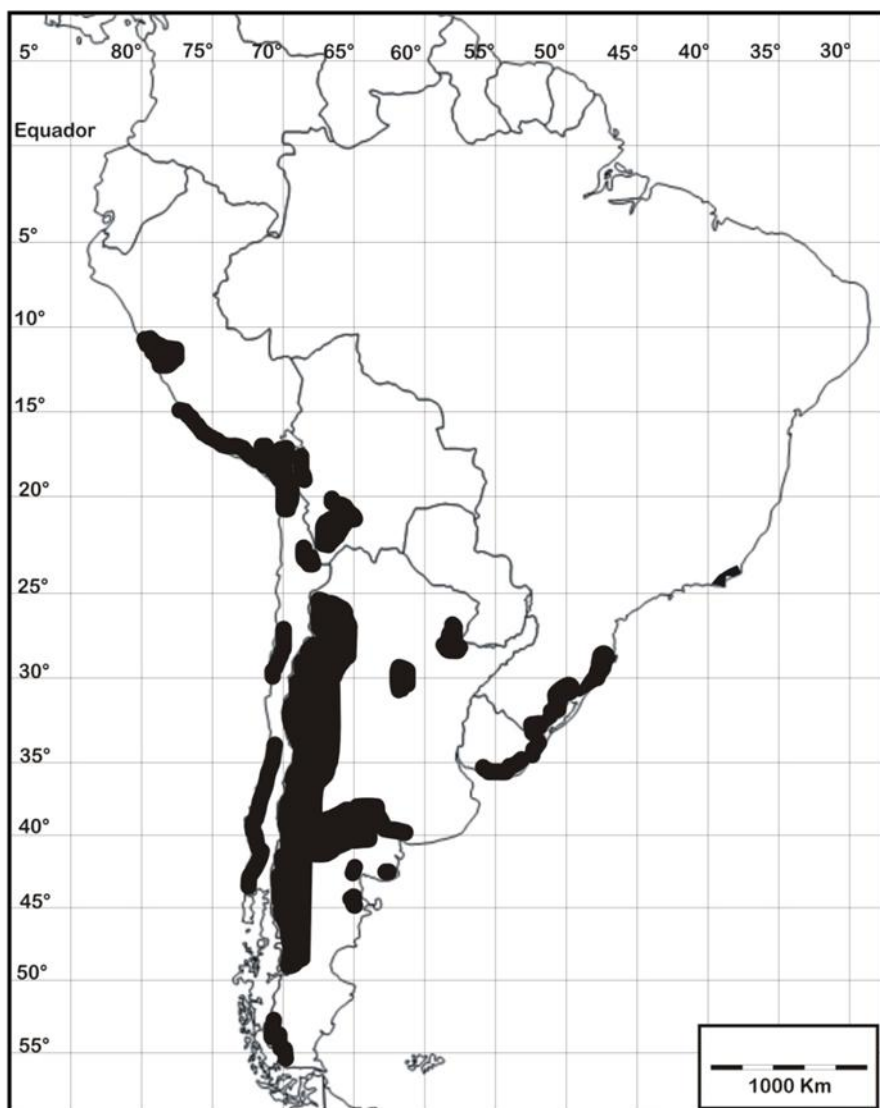


Figura 3. Distribuição do gênero *Liolaemus* na América Latina, em preto, elaborado a partir de dados obtidos em <http://data.gbif.org>.





Figura 4. Mapa de distribuição de *Liolaemus occipitalis* marcada em amarelo. Mapa elaborado a partir de informações bibliográficas da distribuição da espécie (Verrastro *et al.*, 2006).



Figura 5. *Liolaemus occipitalis* sobre substrato típico de seu habitat. Foto: André Martins



Figura 6. Mapa de distribuição de *Liolaemus arambarensis* marcado em amarelo. Mapa elaborado a partir de informações bibliográficas da distribuição da espécie (Verrastro *et al.*, 2003).



Figura 7. *Liolaemus arambarensis* sobre substrato típico de seu habitat. Foto: Márcio Borges-Martins.

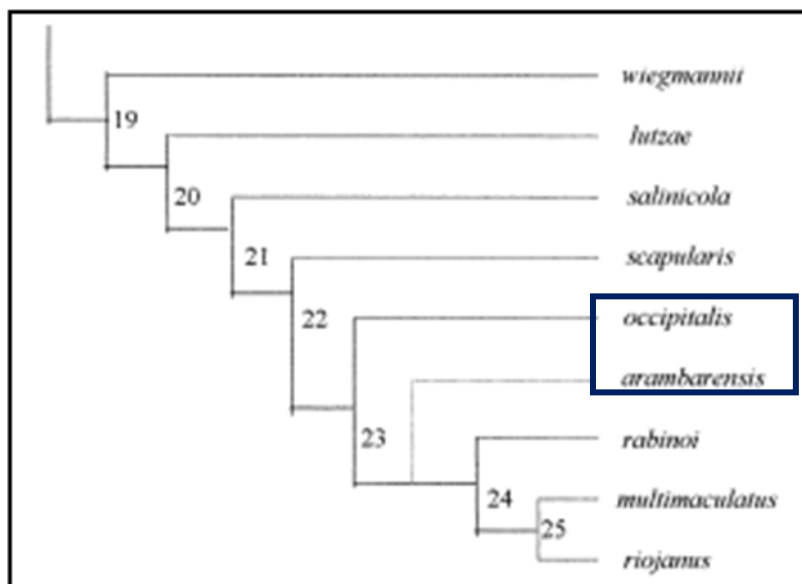


Figura 8. Hipótese filogenética proposta por Etheridge (2000 *in* Verrastro *et al.*, 2003) a partir de caracteres morfométricos e merísticos. Em destaque relação das espécies selecionadas para este estudo.

### 3.4. Área de estudo

Foram utilizadas amostras de indivíduos de *Liolaemus occipitalis* e *L. arambarensis* coletados ao longo de sua área de distribuição (Tabela 3) (Figura 9).

Tabela 3. Lista das localidades amostradas neste estudo. Número dos espécimes depositados em coleção.

Espécie (fenótipo)	Localidade	Nº coleção UFRGST <sup>1</sup>
<i>Liolaemus occipitalis</i> (claro)	Praia dos Ingleses – SC	465-468
	Praia da Joaquina – SC	267-269, 273
	Praia de Garopaba - SC	456-459
	Morro dos Conventos - SC	260, 261
	Torres – RS	246-248, 252
	Cidreira – RS	309-311
	Mostardas – RS	298-300, 306
	São José do Norte – RS	234- 236, 242
	Rio Grande – RS	275-280
	Taim - RS (210)	210-215
	Chuí – RS	289-291
	Valizas - UY	904- 906
	Barra del Chuy-UY	907-909
<i>Liolaemus arambarensis</i> (escuro)	Tapes – RS	431-440
	Arambaré – RS	477-478, 480, 482-484, 489
	Barra do Ribeiro-RS	811-815,850, 851

<sup>1</sup>Coleção de Tecidos do Laboratório de Herpetologia, Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, curadora Profa. Dra. Laura Verrastro.





Figura 9. Mapa da distribuição dos pontos de coleta das amostras. 1- Praia dos Ingleses, SC; 2- Praia da Joaquina, SC; 3- Praia da Garopaba, SC; 4- Morro dos Conventos, SC; 5- Torres, RS; 6- Cidreira, RS; 7- Mostardas, RS; 8- São José do Norte, RS; 9- Rio Grande, RS; 10- Taim, RS; 11- Chuí, RS; 12- Barra del Chuy, UY; 13- Valizas, UY; 14- Barra do Ribeiro, RS; 15- Tapes, RS; 16- Arambaré, RS.

#### 4. OBJETIVOS

O estudo tem por finalidade analisar o gene receptor de melanocortina-1 (*MC1R*), verificando ocorrência de polimorfismos e testar possível associação com o padrão de coloração corporal de *Liolaemus occipitalis* e *L. arambarensis* (Iguania: Liolaemidae).

Dentre os objetivos específicos destacam-se:

- Analisar seqüências do gene *MC1R* e identificar possível associação de polimorfismos com os fenótipos claro (*L. occipitalis*) e escuro (*L. arambarensis*);
- Inferir a seqüência de aminoácidos codificados pelo gene *MC1R*, analisar a taxa de conservação, caracterizar as substituições a fim de inferir se estão em sítios funcionalmente importantes da proteína;
- Testar seleção positiva do gene *MC1R*.

## 5 – ARTIGO

Melanocortin-1 receptor (*MC1R*) is not responsible for cryptic coloration in two  
South American sand lizards of the genus *Liolaemus*

Artigo em preparação para Journal of Heredity

Melanocortin-1 receptor (*MC1R*) is not responsible for cryptic coloration in two South American sand lizards of the genus *Liolaemus*

Josmael Corso – Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil - josmaelcorso@gmail.com

Gislene Lopes Gonçalves – Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil - lopes.goncalves@ufrgs.br

Thales R. O. de Freitas – Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil - thales.freitas@ufrgs.br



## Abstract

A major goal of evolutionary biology is to elucidate the molecular basis of adaptive phenotypic variation. In this study we analyzed the coding region of the melanocortin-1-receptor (*MC1R*) in two sympatric species of sand lizards (*Liolaemus*) with different dorsal body colors associated with their different substrate environments. Five synonymous substitutions were found in *L. arambarensis*; none of them associated with body coloration. Comparative analysis indicated that both *Liolaemus* species are monomorphic for amino acid sites that are functionally important for reptiles. Our results suggest that structural or regulation differences in other genes, rather than in *MC1R*, underlie body pigmentation in this group.

Key words: melanocortin-1 receptor, adaptation, pigmentation, *Liolaemus*

## Introduction

Body coloration in animals has long attracted the attention of evolutionary biologists. To expand the understanding of color patterns is critical to understand the connection between genotype and phenotype. The pigmentation system is affected by selective forces such as crypsis, aposematism, thermoregulation and sexual signaling, all of which drive variation in both pigmentation and color pattern (Hoekstra 2006).

Most studies on animal pigmentation have focused on the melanin system, in which specialized cells known as melanocytes produce either of two pigments — eumelanin or pheomelanin — resulting in different tone and color of skin, hair and feathers. A high concentration of eumelanin produces a dark appearance, whereas pheomelanin usually results in a brown or reddish phenotype (Skoglund and Höglund 2010).

With some exceptions, melanism involves the *MC1R* gene, which encodes the melanocortin-1 receptor (Mundy 2005; Vidal *et al.* 2010). Indeed, numerous amino acid substitutions within the coding region of this gene have

been reported a strong association with a surprisingly large number of vertebrate species, including birds (Theron *et al.* 2001; Mundy 2005; Baião *et al.* 2007), reptiles (Rosenblum *et al.* 2004, 2009) and mammals (Ritland *et al.* 2001; Eizirik *et al.* 2003; Hoekstra 2006; Loehr *et al.* 2008). Other studies have shown that *MC1R* does not seem to be involved in color differences (birds: MacDougall-Shackleton *et al.* 2003 and Cheviron *et al.* 2006; reptiles: Rosenblum *et al.* 2004; and mammals: Mundy and Kelly 2003; Hosoda *et al.* 2005; Anderson *et al.* 2009).

In reptiles, melanophores produce only eumelanin, and therefore *MC1R* activity might simply affect the amount of melanin produced. In spite of these differences, changes in the production and dispersion of melanin granules are ultimately responsible for changes in the dorsal color of reptiles (Rosenblum *et al.* 2004). Geographical variation in dorsal color is common in reptiles, and selective pressures can often be inferred. In some cases, color variation coincides with the different colors of the substrates (cryptic); while in other

cases, color variation seems to be associated with different thermal environments (Rosenblum *et al.* 2004; Clusella-Trullas *et al.* 2008).

Lizards of the genus *Liolaemus* (Iguania: Liolaemidae) include species of small to moderate-size (Etheridge 2000). They live in a variety of habitats, in extensive areas of aeolian sand, including the coastal sand beaches of Chile, Argentina, Uruguay and southeastern Brazil, and the sand flats and dune systems scattered throughout much of the interior of Argentina and Chile (Etheridge 2000). The genus is characterized by great ecological versatility, with variable, often cryptic color patterns (Etheridge 2000; Silva and Verrastro 2007).

*Liolaemus occipitalis* is restricted to coastal sand dunes in the states of Santa Catarina and Rio Grande do Sul, Brazil. It has a cryptic color pattern that makes it inconspicuous in its background environment (Bujes and Verrastro 2006).

*Liolaemus arambarensis* is endemic to restingas (coastal dune forests) around the Patos Lagoon in southern Brazil (Silva and Verrastro 2007). *Liolaemus occipitalis* is light-colored and lives on light sandy soils. The body color of *L. arambarensis* is darker than that of *L. occipitalis*; the dunes where it lives

consist of darker sand from the interior of the continent, and therefore its body color is also cryptic (Verrastro *et al.* 2003; Bujes and Verrastro 2006).

We examined sequence variations in a portion of the MC1R gene in these lizard species, as an initial step for a genetic investigation of body coloration. Our main question was whether the color differences between the two species are caused by variation in the *MC1R* gene. If the same coloration pattern occurs repeatedly across taxa, are the same genes responsible for the similar pattern?

## Materials and Methods

The samples were collected from across the ranges of both species. We examined a total of 50 individuals of *Liolaemus occipitalis*, here termed “light”, and 27 individuals of *L. arambarensis*, termed “dark” (Table 1). The number of specimens of each species differed because of the wider distribution of *L. occipitalis*.

We designed primers for the *MC1R* gene using the sequence from *Phrynosoma platyrhinos* (AY586114). The base pair numbers in the primer names refer to nucleotide positions of the start codon in the lizard gene in GenBank. The sequence was PCR-amplified using primers MC1R\_F 220 5'-TACTACTTCATCTGCTGCCTGGC-3' and MC1R\_R 870 5'-GCATAAATGATGGGGTCCAC-3', under the following conditions: initial denaturation cycle at 94°C for 3 min, 30 s at 94°C, 45 s at 61.5°C, and 60 s at 72°C (30 cycles), followed by a final 5-min extension period at 72°C. PCR products were sequenced directly with the amplification primers, using an ABI3730 automatic sequencer (Applied Biosystems). Potential heterozygous sites were identified by visual inspection of the chromatograms, and confirmed by sequencing the complementary strand. We aligned and translated to amino acid sequences using Bioedit 7.0.9.0 (Hall 1999).

We calculated the number of variable sites, number of haplotypes, haplotype diversity, and nucleotide diversity in the program DNASP v5 (Librado and Rozas 2009). We tested for evidence of selection at MC1R by calculating

Tajima's D statistic and Fu's neutrality test (FS) using ARLEQUIN 3.1 (Excoffier et al. 2005). The sequences were deposited in GenBank under the following accession numbers: MC1R (JF825310-JF825386).

## Results

We amplified a portion (630 bp) of the coding region of the *MC1R* gene, which includes all of the sites known to be involved in color variation in other reptiles, and also includes most of the mutations known for vertebrates. Twelve polymorphisms were observed, of which five were nonsynonymous (Table 1). Five nucleotide polymorphisms were observed exclusively in *Liolaemus arambarensis* (Table 1).

The substitution at amino acid site 88 from Glu>Ala occurred in 11 individuals of *Liolaemus occipitalis* (260, 261: Morro dos Conventos, Santa Catarina – SC; 275, 276, 277, 278, 279, 280: Rio Grande – RS; 211, 212, 214: Taim, RS) and three individuals of *L. arambarensis* (479, 481, 485: Arambaré, RS); this change is from a negative polar amino acid to a neutral nonpolar charged amino acid. Another substitution at site 93 from Val>Ala occurred for

only one locality of *L. occipitalis* (309, 310, 311: Cidreira, RS), both were an uncharged amino acid. At site 110 from Ser>Thr in three individuals of *L. occipitalis* (210, 213, 215: Taim, RS), both were neutral polar. At site 293 from Pro>Leu in individuals of *L. occipitalis* (456, 457, 458, 459: Praia da Garopaba, SC) were an uncharged amino acid. At site 293, another substitution occurred, from Pro>Thr (210, 211, 212, 213, 214, 215: Taim, RS; 907, 908, 909: Barra del Chuy, Uruguay) and in three specimens of *L. arambarensis* (432, 434, 435: Arambaré, RS), the change was from an uncharged amino acid to a neutral polar amino acid (Table 1).

Seven polymorphic sites were variable among the light haplotypes, whereas two sites were variable among the dark haplotypes (Table 1). The ratio of variant to invariant sites was significantly different between light and dark alleles (7/630 and 2/630, Fisher's exact test,  $P < 0.01$ ). The mean level of nucleotide diversity among light alleles ( $\pi = 0.0025$ ) was higher than the nucleotide diversity among dark alleles ( $\pi = 0.0006$ ) (Table 2). We did not observe any predicted protein sequence that was unique for each species. We



first determined Tajima's D statistic, a measure of the relationship between the number of segregating sites (SNPs) and nucleotide diversity; tests of selection by Tajima's D statistic in *L. occipitalis* and *L. arambarensis* indicated non-significant results ( $D = 0.981$ ,  $p < 0.02$ ) (Table 2). Fu's FS test of neutrality is a method to further evaluate the polymorphic patterns under population growth and genetic hitchhiking. The values were not statistically significant for these sand lizards ( $p > 0.02$ ), i.e., there was no deviation from neutrality (Table 2).

The *MC1R* haplotypes and the frequencies of the haplotypes in each species are shown in Tables 1 and 2. *Liolaemus occipitalis* has 9 haplotypes, H1-H9. *Liolaemus arambarensis* has 3 haplotypes, D1-D3. All haplotypes are exclusive of a species (Figure 1,2). In a haplotype network, *L. occipitalis* haplotype H1 formed a cluster with individuals of populations distributed throughout the territory of the species (Figure 1). In *L. arambarensis*, the most frequent haplotype, D1, was also present in all populations of the species (Figure 2).

## DISCUSSION

In *Liolaemus* studied, a straightforward relationship between the variation of *MC1R* gene and the color phenotypes was not observed. No common amino acid replacement was found exclusively in *L. arambarensis*, the dark-colored species, although exclusive nucleotide polymorphisms were found. Moreover, known amino acid replacements associated with dark-colored phenotypes in other lizard species were not found in this species (e.g., replacement sites in 168, 170 and 208; Rosenblum *et al.* 2004; 2009).

Previous reports of the effects of *MC1R* gene in vertebrates, including mammals, birds and reptiles with dark and light polymorphism (e.g., Ritland *et al.* 2001; Theron *et al.* 2001; Mundy *et al.* 2004; Rosenblum *et al.* 2009), have found very strong associations between nonsynonymous single nucleotide polymorphisms (SNPs) and color characteristics. For instance, in the Eastern Fence Lizard (*Sceloporus undulatus*), Little Striped Whiptail (*Aspidoscelis inornata*) and Lesser Earless Lizard (*Holbrookia maculata*), single point

mutations for amino acids 168, 170 and 208, respectively, are strongly associated with the degree of melanism (Rosenblum *et al.* 2009). Nevertheless, we did not detect any association between the amino acid variation at MC1R and the degree of melanism in sand lizards.

Many mutations of the MC1R protein associated with melanism are located around the boundary of the second transmembrane domain and the second extracellular loop, or the third transmembrane domain and third extracellular loop (McRobie *et al.* 2009). In this position there is an acidic domain where there is likely to be an interaction with the positively charged arginine of the  $\alpha$ -MSH (Garcia-Borrón *et al.* 2005; McRobie *et al.* 2009). This domain includes three acidic residue sites (Glu94, Asp117 and Asp121), which are well conserved in the sequences of all vertebrate species, including the sand lizards studied. In addition, this MC1R region is of great interest for understanding the receptor behavior, because each mutation can have opposite consequences according to electrostatic modification (Peterschmitt *et al.* 2009).

The ratio of the rates of nonsynonymous and synonymous substitution ( $dN/dS$ ) is widely used to test the selective neutrality of protein coding genes. Most nonsynonymous substitutions are eliminated from populations by purifying selection (Nakayama *et al.* 2008). However, we did not observe any nonsynonymous substitutions associated with the differing color phenotypes in sand lizards in the sequence region of MC1R. In view of the great diversity of sites in MC1R that are potentially associated with changes in color, there is no perceptible pattern of which sites are responsible for changes, much less among species of the same group or between groups. Previous studies of reptiles have found species with polymorphism in coloration and association with the *MC1R* gene, and also species that did not show such an association (Rosenblum *et al.* 2004). In species in which changes in the gene were associated with the light/dark color, a single site of the protein was found to be responsible. In other taxa such as birds and mammals (except for some cases in which the same site of the protein is responsible for light/dark alterations in different species), many substitutions are found in only one species, i.e., there

is no consistent pattern of sites responsible for the formation of a particular phenotype. The existence of different molecular bases for the same phenotype in two different taxa provides strong evidence for convergent phenotypic evolution on a relatively short time scale (Nachman *et al.* 2003). Different sites are responsible for similar effects. However, previous studies, cited above, that included 3D modeling have indicated certain regions of the protein as most likely replacements, such as the region of the second and third transmembrane domain or the second and third extracellular loop on the MC1R (McRobie *et al.* 2009).

Whereas for some reptiles, gene activity is altered by the influence of the mutation in the *MC1R* gene, in others, such as sand lizards, other genetic variations may influence the phenotype, *e.g.*, at one or more loci downstream of *MC1R*. The results of this study encourage further analysis of the *MC1R* gene and the factors that regulate the expression of the gene.

Forsman *et al.* (2008) proposed that color polymorphism may not only increase the rate of sympatric speciation, but also enhance the rates of

allopatric, peripatric and parapatric speciation by serving as a precursor to geographical variation. This may have occurred in the speciation of the sand-lizard group, as a result of natural selection for background color matching.

This study did not include analysis of noncoding regions (promoter region and 3' untranslated region) of the *MC1R* gene. Recently, mutations in regulatory regions have been proposed as a mechanism to fine-tune phenotypes, because mutations in specific cis-regulatory elements may alter the expression of a protein in particular tissues, while preserving expression in others (Hoekstra 2006; Nakayama *et al.* 2008). However, all known mutations in the *MC1R* gene, many of which are adaptive, occur in the coding region, either as amino acid changes or as small deletions (reviewed by Hoekstra 2006; Majerus and Mundy 2003). However, analysis of the noncoding region of *MC1R* and the other genes associated with pigmentation may be another way to understand the development of light/dark color in reptiles.

Hoekstra (2006) listed several genes that have been associated with light-colored or albino phenotypes, suggesting that there are several ways to

"lose" pigmentation; whereas for the "gain", until now, only the *MC1R* gene has been associated, also indicating that the *MC1R* gene has no pleiotropic effects. Currently there are 368 described loci that act on pigmentation in vertebrates (more than 150 cloned and 209 uncloned genes) (Oetting *et al.* 2009). It is possible that many of these loci may be found in reptiles; however, to date no studies have targeted this group.

In reptiles, the development of light/dark phenotypes might be aided by adaptation to different environments. Melanism has evolved repeatedly in vertebrates, likely driven by both natural and sexual selection so at the polymorphism level, the *MC1R* shows nonneutral evolution (Hoekstra 2006; Nakayama *et al.* 2008). First, consider that melanism is the occurrence of individuals that are darker in pigmentation, either as polymorphisms within species or as consistent variation between closely related species (True 2003). Second, the role of melanism in ectotherms has often been difficult to determine, and several hypotheses may explain its occurrence. Among these, thermoregulation, cryptic coloration, aposematism, protection from ultraviolet

radiation, disease resistance and sexual selection are the most prominent (Clusella-Trullas *et al.* 2008).

Moreover, melanistic diurnal species inhabit cooler areas than do lighter-colored species; melanism confers greater fitness in cold climates; there is a tradeoff between melanism and body size; and color, behavior and physiology may evolve together, and are coadapted (Clusella-Trullas *et al.* 2008). Although the coastal climate–melanism association seems plausible, only a few authors have provided data supporting the thermal-melanism hypothesis in these regions (Clusella-Trullas *et al.* 2008). We can deduce the influence of location on the species of *Liolaemus* studied here, with wider seasonal temperature variations in the continental than in the maritime areas. Thus, *Liolaemus arambarensis*, which inhabits the interior of the continent, may have developed a greater degree of melanization as a thermal-adjustment mechanism. *Liolaemus occipitalis*, which inhabits the first line of dunes, i.e., in contact with the ocean and with narrower temperature ranges, has a lesser degree of melanization. Temperature influences the melanocyte-stimulating hormone,



which affects melanin dispersion. Other studies have shown how visual features such as size, contrast, configuration, texture and edges of background objects influence the type of camouflage pattern adopted by species (Zylinski *et al.* 2009; Stuart-Fox and Moussalli 2009).

In reptiles, little is known about the genetic basis of pigmentation. Rosenblum *et al.* (2004; 2009) investigated the molecular evolution of *MC1R* and the adaptive function of color variation in seven species of squamate reptiles, found association between mutations in the *MC1R* gene and color variation in three species. Based on their results, we must discard the presence of mutations in the *MC1R* gene that can be directly linked to the phenotype of *Liolaemus* species. In the opposite it is affirmed that there is no single pattern of change in *MC1R* sites that is responsible for variation in the phenotype. Furthermore, are vast possibilities that lead to variation in pigmentation in reptiles showing the complex interaction of factors and mechanisms that act in this group, encouraging us to search for ways to elucidate the genetic basis of color in this group.

## **Funding**

This study was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## **Acknowledgments**

We thank Caroline M. Silva and Laura Verrastro for their generosity in sharing the tissue samples used in this study.

## References

Anderson TM, von Holdt BM, Candille SI, Musiani M, Greco C, Stahler DR, Smith DW, Padhukasahasram B, Randi E, Leonard JA, Bustamante CD, Ostrander EA, Tang H, Wayne RK, Barsh GS, 2009. Molecular and Evolutionary History of Melanism in North American Gray Wolves. *Science* 323:1339–1343.

Baião PC, Schreiber EA, Parker PG, 2007. The genetic basis of the plumage polymorphism in red-footed booby (*Sula sula*): a Melanocortin-1 Receptor (MC1R) analysis. *J Hered.* 98:287–292.

Bujes SC, Verrastro L, 2006. Thermal biology of *Liolaemus occipitalis* (Squamata, Tropicuridae) in the coastal sand dunes of Rio Grande do Sul, Brazil. *Braz J Biol.* 66(3):945-954.

Cheviron ZA, Hackett SJ, Brumfield RT, 2006. Sequence variation in the coding region of the melanocortin-1receptor gene (MC1R) is not associated with plumage polymorphism in the Blue-crowned Manakin (*Lepidothrix coronata*). *Proc R Soc B* 273:1613-1618.

Clusella-Trullas S, Terblanche JS, Blackburn TM, Chown SL, 2008. Testing the thermal melanism hypothesis: a macrophysiological approach. *Funct Ecol.* 22:232–238.

Eizirik E, Yuhki N, Johnson WE, Menotti-Raymond M, Hannah SS, O'Brien SJ, 2003. Molecular genetics and evolution of melanism in the cat family. *Curr Biol.* 13:448–453.

Etheridge R, 2000. A review of lizards of the *Liolaemus wiegmanni* group (Squamata, Iguania, Tropicuridae), and a history of morphological change in the sand-dwelling species. *Herpetol Monogr.* 14:293-352.

Excoffier L, Laval G, Schneider S, 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1:47-50.

Forsman A, Nesjo J, Caesar S, Karlsson M, 2008. A model of ecological and evolutionary consequences of color polymorphism. *Ecology* 89:34–40.

Garcia-Borron JC, Sanchez-Laorden BL, Jimenez-Cervantes C, 2005.

Melanocortin-1 receptor structure and functional regulation. *Pigment Cell Res.*

18:393–410.

Hall TA, 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and

analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser.* 41:95-98.

Hoekstra HE, 2006. Genetics, development and evolution of adaptive

pigmentation in vertebrates. *Heredity* 97:222–234.

Hosoda T, Sato JJ, Shimada T, Campbell KL, Suzuki H, 2005. Independent

nonframeshift deletions in the MC1R gene are not associated with melanistic

coat coloration in three mustelid lineages. *J Hered.* 96(5):607–613.

Librado P, Rozas R, 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analyses

of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451-1452.

Loehr J, Worley K, Moe J, Carey J, Coltman DW, 2008. MC1R variants

correlate with thinhorn sheep colour cline but not individual colour. *Can J Zool.*

86:147-150.

Majerus MN, Mundy NI, 2003. Mammalian melanism: natural selection in black

and white. *Trends Genet.* 19:585–588.

McRobie H, Thomas A, Kelly J, 2009. The Genetic Basis of Melanism in the Gray Squirrel (*Sciurus carolinensis*). *J Hered.* 100:709-714.

MacDougall-Shackleton EA, Blanchard L, Gibbs HL, 2003. Unmelanized plumage patterns in Old World leaf warblers do not correspond to sequence variation at the melanocortin-1 receptor locus (MC1R). *Mol Biol Evol.* 20:1675–1681.

Mundy NI, Kelly J, 2003. Evolution of a pigmentation gene, the melanocortin-1 receptor, in primates. *Am J Phys Anthropol.* 121:67–80.

Mundy NI, Badcock NS, Hart T, Scribner K, Janssen K, Nadeau NJ, 2004. Conserved genetic basis of a quantitative plumage trait involved in mate choice. *Science* 303:1870–1873.

Mundy NI, 2005. A window on the genetics of evolution: MC1R and plumage colouration in birds. *Proc R Soc B* 272:1633–1640.

Nachman MW, Hoekstra HE, D'Agostino SL, 2003. The genetic basis of adaptive melanism in pocket mice. *Proc Natl Acad Sci.* 100(9):5268-5273.

Nakayama K, Shotake T, Takeneka O, Ishida T, 2008. Variation of the Melanocortin 1 Receptor Gene in the Macaques. *Am J Primatol.* 70:778–785.

Oetting WS, Austin LM, Bennett DC, 2009. Color genes: European Society for Pigment Cell Research. Available from: <http://www.espcr.org/micemut>.

Peterschmitt M, Grain F, Arnaud B, Deléage G, Lambert V, 2009. Mutation in the melanocortin 1 receptor is associated with amber colour in the Norwegian Forest Cat. *Anim Genet.* 40(4):547-552.

Ritland K, Newton C, Marshallet HD, 2001. Inheritance and population structure of the white-phased 'Kermode' black bear. *Curr Biol.* 11:1468–1472.

Rosenblum EB, Hoekstra HE, Nachman MW, 2004. Adaptive reptile color variation and the evolution of the MC1R gene. *Evolution* 58:1794–1808.

Rosenblum EB, Römpler H, Schöneberg T, Hoekstra HE, 2009. Molecular and functional basis of phenotypic convergence in white lizards at White Sands. *Proc Natl Acad Sci.* 107(5):2113–2117.

Silva CM, Verrastro L, 2007. Descrição do esqueleto axial de *Liolaemus arambarensis* Verrastro, Veronese, Bujes & Dias Filho (Iguania, Liolaemidae): regiões pré-sacral e sacral. Rev Bras Zool. 24:1-11.

Skoglund P, Höglund J, 2010. Sequence Polymorphism in Candidate Genes for Differences in Winter Plumage between Scottish and Scandinavian Willow Grouse (*Lagopus lagopus*). PLoS One 5(4): e10334.

Stuart-Fox D, Moussalli A, 2009. Camouflage, communication and thermoregulation: lessons from colour changing organisms. *Phil Trans R Soc B* 364(1516):463-470.

Theron E, Hawkins K, Bermingham E, Ricklefs RE, Mundy NI, 2001. The molecular basis of an avian plumage polymorphism in the wild: a melanocortin-1-receptor point mutation is perfectly associated with the melanic plumage morph of the bananaquit, *Coereba flaveola*. Curr Biol. 11: 550–557.

True JR, 2003. Insect melanism: the molecules matter. Trends Ecol Evolut. 18:640–647.



Verrastro L, Veronese L, Bujes C, Dias Filho MM (2003) A new species of *Liolaemus* from southern Brazil (Iguania, Tropiduridae). *Herpetology* 59:252-277.

Vidal O, Araguas RM, Fernández R, Heras S, Sanz N, Pla C, 2010. Melanism in guinea fowl (*Numida meleagris*) is associated with a deletion of Phenylalanine-256 in the *MC1R* gene. *Anim Genet.* 41:656-658.

Zylinski S, Osorio D, Shohet AJ, 2009. Perception of edges and visual texture in the camouflage of the common cuttlefish *Sepia officinalis*. *Phil Trans R Soc B* 364:439–448.

## Legends

Table 1. Distribution of sampling localities of specimens of *Liolaemus occipitalis* and *L. arambarensis*. *MC1R* haplotypes and sequence polymorphism in nucleotide and amino acid sites. All *L. arambarensis* individuals are monomorphic for five sites (273, 393, 399, 495, 867 nucleotide position). Nucleotide sites and amino acid are numbered with reference to the *Phrynosoma platyrhinos MC1R* sequence (AY586114).

<sup>1</sup>*Liolaemus occipitalis*;

<sup>2</sup>*L. arambarensis*;

<sup>3</sup>SC - State of Santa Catarina , Brazil;

<sup>4</sup>RS - State of Rio Grande do Sul, Brazil;

<sup>5</sup>UY – Uruguay.

Table 2. Summary statistics of genetic variation and statistical tests of neutrality for phased sequence data used in the study.

All results are given for the whole dataset and for *Liolaemus occipitalis* and *L. arambarensis* subpopulations: N is the number of specimens, S is the number of segregating sites,  $\theta$  is the nucleotide diversity, h is the number of haplotypes, Hd is nucleotide diversity, D is Tajima's test of neutral model, and Fs is Fu's Fs test of neutral model, P<0.02.

Figure 1. *MC1R* haplotype network of *Liolaemus occipitalis*. Circle areas are proportional to sample sizes. Each line segment represents a single substitution.

Figure 2. *MC1R* haplotype network of *Liolaemus arambarensis*. Circle areas are proportional to sample sizes. Each line segment represents a single substitution.

Table 1. Sampling localities of specimens of *Liolaemus occipitalis* and *L. arambarensis*. *MC1R* haplotypes and sequence polymorphism in nucleotide and amino acid sites. All *L. arambarensis* individuals were monomorphic for five sites (273, 393, 399, 495, 867 nucleotide position). Nucleotide sites and amino acid are numbered with reference to the *Phrynosoma platyrhinos MC1R* sequence (AY586114).

Species	Population	Specimens	Haplotypes	Nucleotide sites												Amino acid sites			
				2	2	2	3	3	3	4	4	5	8	8	8	8	9	1	2
				6	7	7	2	9	9	7	9	2	6	7	7	8	3	1	9
				2	3	8	8	3	9	1	5	8	7	7	8			0	3
<i>L. occ.</i> <sup>1</sup>	Praia dos Ingleses, SC <sup>3</sup>	465-468	H1	A	C	T	T	G	C	G	C	T	A	C	C	E	V	S	P
	Praia da Joaquina, SC	267-269, 273	H2	.	.	.	.	.	.	A	.	C	.	.	.	.	.	.	.
	Praia da Garopaba, SC	456-459	H3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	L
	Morro dos Conventos, SC	261, 260	H4	C	.	.	.	.	.	A	.	C	.	.	.	A	.	.	.
	Torres, RS <sup>4</sup>	246-248, 252	H2	.	.	.	.	.	.	A	.	C	.	.	.	.	.	.	.
	Cidreira, RS	309-311	H5	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.
	Mostardas, RS	298-300, 306	H1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	São José do Norte, RS	234-236, 242	H1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	Rio Grande, RS	275-280	H6	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.
	Taim, RS	210, 213, 215	H7	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.
		211, 212, 214	H8	C	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	A	.	.	T
	Chuí, RS	289-291	H1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	Valizas, UY <sup>5</sup>	904-906	H1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	Barra del Chuy, UY	907-909	H9	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	T
<i>L. ara.</i> <sup>2</sup>	Tapes, RS	431, 433, 436-440	D1	.	T	.	.	T	T	.	T	.	G	.	.	.	.	.	.
		432, 434, 435	D2	.	T	.	.	T	T	.	T	.	G	A	.	.	.	.	T
	Arambaré, RS	477, 478, 480, 482-484, 489	D1	.	T	.	.	T	T	.	T	.	G	.	.	.	.	.	.
		479, 481, 485	D3	C	T	.	.	T	T	.	T	.	G	.	.	A	.	.	.
	Barra do Ribeiro, RS	811-815, 850, 851	D1	.	T	.	.	T	T	.	T	.	G	.	.	.	.	.	.
	Codon position			2	3	2	1	3	3	3	3	3	3	1	2				

<sup>1</sup>*Liolaemus occipitalis*; <sup>2</sup>*L. arambarensis*; <sup>3</sup>SC - State of Santa Catarina, Brazil; <sup>4</sup>RS - State of Rio Grande do Sul, Brazil; <sup>5</sup>UY – Uruguay.

Table 2. Summary statistics of genetic variation and statistical tests of neutrality for phased sequence data used in the study.

Species	N	S	$\Pi$	H	Hd	D	Fs
<i>L. occipitalis</i>	50	7	0.00250	9	0.813		
<i>L. arambarensis</i>	27	2	0.00065	3	0.384		
MC1R gene	77					0.981	-0.679

All results are given for the whole dataset and for *Liolaemus occipitalis* and *L. arambarensis* subpopulations: N is the number of specimens, S is the number of segregating sites,  $\pi$  is the nucleotide diversity, h is the number of haplotypes, Hd is the nucleotide diversity, D is Tajima's test of neutral model, and Fs is Fu's Fs test of neutral model,  $P < 0.02$ .

Figure 1. *MC1R* haplotype network of *Liolaemus occipitalis*. Circle areas are proportional to sample sizes. Each line segment represents a single substitution.

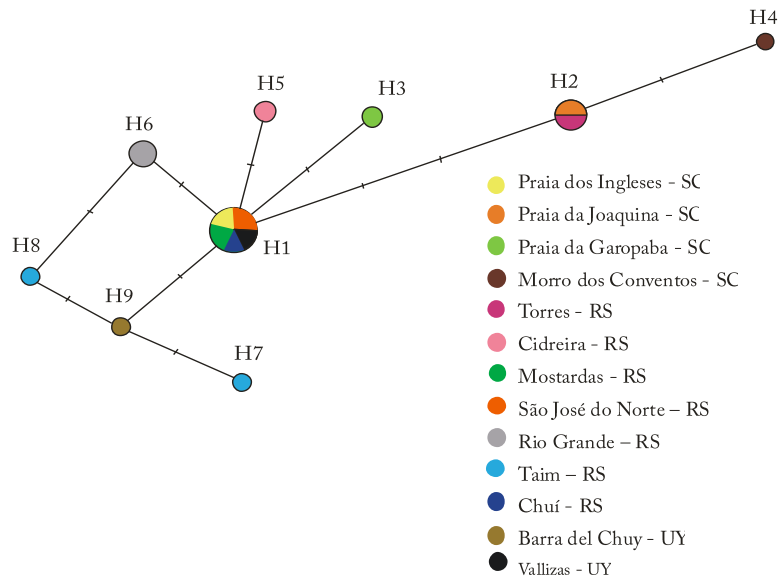
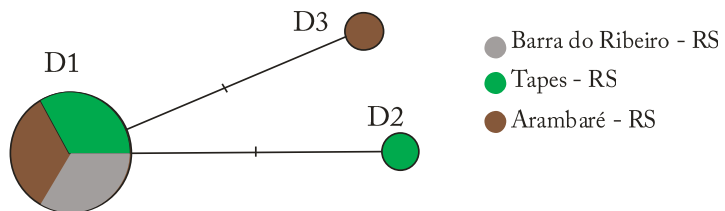


Figure 2. *MC1R* haplotype network of *Liolaemus arambarensis*. Circle areas are proportional to sample sizes. Each line segment represents a single substitution.



## DISCUSSÃO GERAL

### 6.1. Polimorfismos *MC1R* em répteis

Nos lagartos analisados não foi observada relação direta entre a variação do gene *MC1R* e a coloração do corpo. Não foram observadas substituições de aminoácidos exclusivas na espécie de *Liolaemus arambarensis* que apresenta coloração escura, embora, ocorram nucleotídeos exclusivos. Além disso, substituições de aminoácidos conhecidas e associadas com o fenótipo de coloração escura em outras espécies de lagartos não foram observadas em *Liolaemus* (i.e., substituição nos sítios 168, 170 e 208 do gene *MC1R*) (Rosenblum *et al.*, 2004; 2009).

Estudos prévios sobre efeitos causados por alterações do gene *MC1R* em vertebrados incluindo mamíferos, aves e répteis com coloração clara/escuro (e.g. Ritland *et al.* 2001; Theron *et al.* 2001; Mundy *et al.* 2004; Rosenblum *et al.*, 2009) demonstraram forte associação entre polimorfismo de único nucleotídeo (SNPs) e a característica de cor. Por exemplo, em Eastern Fence Lizard (*Sceloporus undulatus*), Little Striped Whiptail (*Aspidoscelis inornata*) e Lesser Earless Lizard (*Holbrookia maculata*) mutações únicas nos sítios de aminoácidos 168, 170 e 208, respectivamente, estão fortemente associadas com o grau de melanismo (Rosenblum *et al.*, 2009). No entanto, não foi detectada nenhuma associação entre a variação de aminoácidos codificados pelo gene *MC1R* e o grau de melanismo dos lagartos *Liolaemus* estudados. Cabe lembrar que o principal efeito relatado em alterações no gene *MC1R* (supressão ou mutação de perda de função) está relacionado com produção exclusiva de feomelanina, ou seja variantes de coloração amarelo-vermelho (Vidal *et al.* 2010).

## 6.2 Localização dos polimorfismos do gene *MC1R* em vertebrados

Muitas mutações do gene *MC1R* associadas ao melanismo codificam aminoácidos que estão localizados entre o segundo domínio transmembranar e a terceira alça extracelular da proteína MC1R (McRobie *et al.*, 2009). Este é um domínio ácido onde há provavelmente interação com a arginina positivamente carregada da  $\alpha$ -MSH (Garcia-Borron *et al.*, 2005; McRobie *et al.*, 2009). Este domínio inclui três sítios de resíduos ácidos (Glu94, Asp117 e Asp121) conservados nas sequências de espécies de vertebrados, incluindo as espécies deste estudo. Além disso, esta região da proteína MC1R é de grande interesse para a compreensão do comportamento do receptor, porque cada mutação pode ter consequências opostas, de acordo com a modificação eletrostática (Peterschmitt *et al.*, 2009).

Este estudo não incluiu análise das regiões não-codificadoras (região promotora e região não-transcrita 3') do gene *MC1R*. Recentemente, mutações em regiões regulatórias têm sido propostas como um mecanismo sintonia-fina de fenótipos uma vez que mutações em determinadas regiões cis-regulatórias podem alterar a expressão de uma proteína específica nos tecidos, preservando a expressão de outras (Hoekstra, 2006; Nakayama *et al.*, 2008). No entanto, todas as mutações conhecidas no gene *MC1R*, muitas das quais adaptativas, ocorrem na região codificante, quer como mudanças de aminoácidos ou pequenas deleções (Hoekstra, 2006; Majerus e Mundy, 2003). Isso não descarta a análise da região não-codificante do *MC1R*, ao contrário, ainda fomenta que sejam estudados outros genes associados com a pigmentação dando suporte para outra forma de entender a coloração em répteis.



Em Hoekstra (2006) estão listados alguns genes que têm sido associados com a coloração clara ou fenótipo albino, sugerindo que há várias maneiras de se "perder" a pigmentação, enquanto que para o "ganho", até agora, apenas o gene *MC1R* tem sido associado, indicando também que o gene *MC1R* não possui efeitos pleiotrópicos. Além disso, atualmente há 368 locis descritos atuando na pigmentação em vertebrados (mais de 150 genes clonados e 209 genes não-clonados) (Oetting *et al.*, 2009) e é possível que muitos destes loci possam ser encontrados em répteis, no entanto, até o momento, não há estudos direcionados para este grupo.

### 6.3. Mutação responsável por fenótipo não segue padrão

A relação entre as taxas de substituição sinônimas e não-sinônimas ( $dS / dN$ ) é amplamente utilizada para testar a neutralidade seletiva de genes codificadores. A maioria das substituições não-sinônimas são eliminadas da população por seleção purificadora. (Nakayama *et al.*, 2008). No entanto, não foram visualizadas quaisquer substituições não-sinônimas do gene *MC1R* associadas com fenótipos distintos nas espécies estudadas. Ao observarmos a grande diversidade de sítios da proteína MC1R potencialmente associados com mudanças na coloração notamos não haver um padrão de quais sítios são responsáveis pela variação, tampouco entre as espécies do mesmo grupo ou entre grupos. Nos répteis, já estudados, foram observadas espécies com polimorfismo na coloração associado ao gene *MC1R*, como também espécies em que esta associação não foi encontrada (Rosenblum *et al.*, 2004).

Nas espécies de répteis que foram associadas alterações no gene com cor clara/escuro percebe-se um único sítio da proteína responsável por esta ação. Em outros grupos, como aves e mamíferos - com exceção de alguns casos em que o mesmo sítio da proteína foi responsável por alterações claro/escuro para as diferentes espécies: evolução paralela - muitas das substituições são encontradas em apenas uma espécie, ou seja, não existe um padrão para os sítios responsáveis pela formação de um fenótipo. A distinta base molecular para o mesmo fenótipo de dois táxons diferentes fornece fortes evidências para a evolução fenotípica convergente num espaço de tempo relativamente curto (Nachman *et al.*, 2003), ou seja, diferentes sítios são responsáveis por efeitos semelhantes. No entanto, estudos já citados anteriormente, que incluíram modelagem 3D, apontaram que determinadas regiões da proteína são mais prováveis de substituições, como é o caso da região do segundo e terceiro domínio transmembrana e a segunda e terceira alça extracelular da proteína MC1R (McRobie *et al.*, 2009). Enquanto que em alguns répteis a atividade dos genes é alterada por influência da mutação, em outros, como os neste estudo, diferentes variações genéticas ou genes podem influenciar o fenótipo.

Forsman *et al.* (2008) propôs que o polimorfismo de cor pode não só promover a taxa de especiação simpátrica, mas também incrementar as taxas de especiação alopátrica, peripátrica e parapátrica, servindo como um precursor para a variação geográfica. Isso pode ter ocorrido como processo de especiação do grupo de *Liolaemus*, como resultado da seleção natural para a cor do substrato.

#### 6.4. A influência de outros fatores sobre a coloração

Os fenótipos claro/escuro podem ser impulsionados pela adaptação a diferentes ambientes nos répteis. Ao nível polimórfico, o gene *MC1R* demonstra evolução não neutra o que pode refletir a seleção natural e sexual sobre fenótipos de pigmentação em várias espécies animais (Mundy *et al.*, 2004; Hoekstra, 2006; Nakayama *et al.*, 2008). Primeiramente é preciso lembrar que melanismo se refere a ocorrência de indivíduos que são mais escuros na pigmentação ou com polimorfismos dentro da espécie ou como variação consistente entre espécies estreitamente relacionadas (True, 2003). Em segundo lugar, o papel de melanismo em ectotérmicos tem sido muitas vezes difícil de determinar uma vez que há várias hipóteses que podem explicar a sua ocorrência. Entre estas, a coloração da termorregulação, crípsis, aposematismo, proteção contra radiação ultravioleta, resistência a doenças e a seleção sexual são as mais proeminentes (Clusella-Trullas *et al.*, 2008).

Além disso, espécies melânicas diurnas habitam áreas mais frias do que as espécies de coloração mais clara, compreendido como resposta a climas frios. Além disso há uma compensação entre melanismo e tamanho do corpo, comportamento e fisiologia de modo que podem evoluir em conjunto, coadaptadas (Clusella-Trullas *et al.*, 2008). Embora a associação do melanismo de clima costeiro pareça plausível, poucos autores têm fornecido dados que apoiam a hipótese de melanismo térmico nessas regiões (Clusella-Trullas *et al.*, 2008). Pode-se especular sobre a influência da continentalidade sobre as espécies de *Liolameus* estudadas. Conforme conceito, ambientes localizados no interior do continente possuem maiores amplitudes térmicas em relação aos ambientes costeiros – influenciados pela maritimidade (Grinsted *et al.*, 2006). O maior grau de melanização da espécie *L.*

*arambarensis* (fenótipo escuro) que habita solos de interior do continente poderia ocorrer como mecanismo de ajuste térmico. Enquanto *L.occipitalis* (fenótipo claro), que habita a primeira linha de dunas, ou seja, em contato com o oceano, onde ocorrem menores amplitudes térmicas possui menor grau de melanização. Assim, podemos considerar a ocorrência da ação da temperatura sobre a coloração, uma vez que ela influencia o hormônio estimulante dos melanócitos ( $\alpha$ -MSH), afetando a dispersão de melanina.

Nos répteis, pouco se sabe sobre a base genética de pigmentação. Entretanto alguns estudos foram iniciados por Rosenblum *et al.* (2004, 2009) os quais investigaram a evolução molecular do gene *MC1R* e a função adaptativa da variação da coloração em sete espécies de Squamata. Na espécie *Sceloporus undulates* (Western Fence Lizards) a coloração foi relacionada à cor do substrato (coloração críptica) – o fenótipo escuro observado no substrato de coloração escura e o fenótipo claro em substrato claro. Outros estudos têm demonstrado que recursos visuais, tais como o tamanho, contraste, configuração, textura e bordas dos objetos de fundo podem influenciar o tipo de padrão de camuflagem que podem ser adaptadas pelas espécies (Zylinski *et al.*, 2009; Stuart-Fox e Moussalli 2009).

Diante dos resultados obtidos descarta-se a presença de mutações no gene *MC1R* que possam ser diretamente associadas ao fenótipo das espécies estudadas. Em oposto faz-se afirmação de não haver um padrão único de alterações dos sítios da proteína *MC1R* responsáveis pela variação no fenótipo. Igualmente, são amplas as possibilidades que levam à variação da pigmentação em répteis, demonstrando a complexidade de fatores e interações de mecanismos que agem nesse grupo, instigando a partir desse passo a busca por caminhos que auxiliem na elucidação da base genética da coloração desse grupo.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anderson TM, von Holdt BM, Candille SI, Musiani M, Greco C, Stahler DR, Smith DW, Padhukasahasram B, Randi E, Leonard JA, Bustamante CD, Ostrander EA, Tang H, Wayne RK and Barsh GS (2009) Molecular and Evolutionary History of Melanism in North American Gray Wolves. *Science* 323: 1339 – 1343.

Avila LJ, Morando M, Perez DR and Sites JW Jr (2010) A new species of the *Liolaemus elongatus* clade (Reptilia: Iguania: Liolaemini) from Cordillera del Viento, northwestern Patagonia, Neuquén, Argentina. *Zootaxa* 2667: 28–42.

Baião PC, Schreiber EA and Parker PG (2007) The genetic basis of the plumage polymorphism in red-footed booby (*Sula sula*): a Melanocortin-1 Receptor (*MC1R*) analysis. *J Hered* 98:287–292.

Barsh GS (1996) The genetics of pigmentation: from fancy genes to complex traits. *Trends Genet* 12: 299-305.

Bittner TD, King RB and Kerfin M (2002) Effects of body size and melanism on the thermal biology of garter snakes (*Thamnophis sirtalis*). *Copeia* 2002:477–482.

Chevion, Z.A, Hackett, S.J., Brumfield, R.T. 2006. Sequence variation in the coding region of the melanocortin-1-receptor gene (*MC1R*) is not associated with plumage variation in the blue-crowned manakin (*Lepidothrix coronata*). *Proc R Soc B* 273: 1613 – 1618.

Clusella-Trullas S, Terblanche JS, Blackburn TM, Chown SL, 2008. Testing the thermal melanism hypothesis: a macrophysiological approach. *Funct Ecol.* 22:232–238.

Doucet SM, Shawkey MD, Rathburn MK, Mays HL and Montgomerie R (2004) Concordant evolution of plumage colour, feather microstructure and a melanocortin receptor gene between mainland and island populations of a fairy-wren. *Proc R Soc B* 271:1663–1670, 2004.

Eizirik E, Yuhki N, Johnson WE, Menotti-Raymond M, Hannah SS and O'Brien SJ (2003) Molecular genetics and evolution of melanism in the cat family. *Curr Biol* 13, 448–453.

Etheridge R (2000) A review of lizards of *Liolaemus wiegmanni* group (Squamata, Iguania, Tropicuridae), and a history of morphological change in the sand-dwelling species. *Herpetological Monographs*, Emporia, 14:293-352.

Fang M, Larson G, Soares Ribeiro H, Li N and Andersson L (2009) Contrasting Mode of Evolution at a Coat Color Locus in Wild and Domestic Pigs. *PLoS Genet* 5(1): e1000341. doi:10.1371/journal.pgen.1000341

Forsman A, Nesjo J, Caesar S, Karlsson M, 2008. A model of ecological and evolutionary consequences of color polymorphism. *Ecology.* 89(1) 34–40.

Garcia TSR, Straus SR and Sih A (2003) Temperature and ontogenetic effects on color change in the larval salamander species *Ambystoma barbouri* and *Ambystoma texanum*. *Can. J. Zool.* 81:710–715.

Garcia-Borrón JC, Sanchez-Laorden BL and Jimenez-Cervantes C (2005) Melanocortin-1 receptor structure and functional regulation. *Pigment Cell Res.* 18:393–410.

Grinsted A, Moore JC, Pohjola V, Martma T, and Isaksson E (2006) Svalbard summer melting, continentality, and sea ice extent from the Lomonosovfonna ice core. *J. Geophys. Res.*, 111, D07110, doi:10.1029/2005JD006494

Gross JB, Borowsky R and Tabin CJ (2009) A novel role for *MC1R* in the parallel evolution of depigmentation in independent populations of the cavefish *Astyanax mexicanus*. *PLoS Genet* 5(1): 1-14 e1000326. doi:10.1371/journal.pgen.1000326

Hoekstra HE (2006) Genetics, development and evolution of adaptive pigmentation in vertebrates. *Heredity* 97:222–34.

Hoekstra HE and Nachman MW (2003) Different genes underlie adaptive melanism in different populations of rock pocket mice. *Mol Ecol* 12: 1185–1194.

Hosoda T, Sato JJ, Shimada T, Campbell KL and Suzuki H (2005) Independent nonframeshift deletions in the *MC1R* gene are not associated with melanistic coat coloration in three mustelid lineages. *J Hered* 96(5):607–613.

Kijas JMH, Wales R, Tornsten A, Chardon P, Moller M and Andersson L (1998) Melanocortin receptor 1 (*MC1R*) mutations and coat color in pigs. *Genetics* 150:1177–1185.

Klungland H, Vage I, Gomez-Raya L, Adalsteinsson S and Lien S (1995) The role of melanocyte-stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat color determination. *Mamm Genome* 6:636–639.

Loehr J, Worley K, Moe J, Carey J and Coltman DW (2008) *MC1R* variants correlate with thinhorn sheep colour cline but not individual colour. *Can J Zool* 86: 147-150.

MacDougall-Shackleton EA, Blanchard L and Gibbs HL (2003) Unmelanized plumage patterns in old world leaf warblers do not correspond to sequence variation at the melanocortin-1 receptor locus (*MC1R*). *Mol Biol Evol* 20:1675–1681.

McRobie H, Thomas A and Kelly J (2009) The Genetic Basis of Melanism in the Gray Squirrel (*Sciurus carolinensis*). *J Hered* 2009 100: 709-714.

Majerus MN and Mundy NI (2003) Mammalian melanism: natural selection in black and white. *Trends Genet.* 19: 585–588.

Marklund L, Moller MJ, Sandberg K and Andersson L (1996) A missense mutation in the gene for melanocyte-stimulating hormone receptor (*MC1R*) is associated with the chestnut coat color in horses. *Mamm Genome* 7:895–899.

Mountjoy K.G, Robbins L.S, Mortrud M.T, Cone R.D. The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science*. 1992;257:1248–1251.

Mundy NI (2005) A window on the genetics of evolution: *MC1R* and plumage colouration in birds. *Proc R Soc B* 272, 1633–1640.

Mundy NI and Kelly J (2003) Evolution of a pigmentation gene, the melanocortin-1 receptor, in primates. *Am J Phys Anthropol* 121:67–80.

Mundy NI, Badcock NS, Hart T, Scribner K, Janssen K and Nadeau NJ (2004) Conserved genetic basis of a quantitative plumage trait involved in mate choice. *Science* 303:1870–1873.

Nachman MW, Hoekstra HE and D'Agostino SL (2003) The genetic basis of adaptive melanism in pocket mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:5268–5273.

Nakayama K, Shotake T, Takenaka O and Ishida T (2008) Variation of the Melanocortin 1 Receptor Gene in the Macaques. *Am J Primatol* 70:778–785.

Newton JM, Wilkie AL, He L, Jordan SA, Metallinos DL, Holmes NG, Jackson IJ and Barsh GS (2000) Melanocortin 1 receptor variation in the domestic dog. *Mamm Genome* 11:24–30.

Oetting WS, Austin LM, Bennett DC, 2009. Color genes: European Society for Pigment Cell Research. Available from: <http://www.espcr.org/micemut>.

Peterschmitt M, Grain F, Arnaud B, Deléage G, Lambert V, 2009. Mutation in the melanocortin 1 receptor is associated with amber colour in the Norwegian Forest Cat. *Anim Genet*. 40(4):547-52.

Protas ME and Patel NH (2008) Evolution of Coloration. *Annu Rev Cell Dev Biol* 24:425–446.

Ritland, K. et al. (2001) Inheritance and population structure of the white-phased 'Kermode' black bear. *Curr. Biol*. 11:1468–1472

Rosenblum EB, Römpler H, Schöneberg T and Hoekstra HE (2009) Molecular and functional basis of phenotypic convergence in white lizards at White Sands. *PNAS*. 107(5):2113–2117.

Rosenblum EB, Hoekstra HE and Nachman MW (2004) Adaptive reptile color variation and the evolution of the *MC1R* gene. *Evolution* 58(8):1794–1808.

Sherbrooke WC, Castrucci AML and Hadley McE (1994) Temperature effects on in vitro skin darkening in the mountain spiny lizard, *Sceloporus jarrovi*: a thermoregulatory adaptation? *Physiol. Zool*. 67:659–672.

Silva CM (2006) Filogeografia e diferenciação morfológica das populações de *Liolaemus occipitalis* Boulenger, 1885 (Iguania: Liolaemidae) ao longo de seu domínio geográfico.

Dissertação de Mestrado - Curso de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre: UFGRS.

Silva CM e Verrastro L (2007) Descrição do esqueleto axial de *Liolaemus arambarensis* Verrastro, Veronese, Bujes & Dias Filho (Iguania, Liolaemidae): regiões pré-sacral e sacral. *Rev Bras Zool* 24 (1): 1-11.

Stuart-Fox D and Moussalli A (2009) Camouflage, communication and thermoregulation: lessons from colour changing organisms. *Phil Trans R Soc B*. 364 (1516): 463-470.

Takeuchi S, Suzuki H, Yabuuchi M and Takahashi S (1996) A possible involvement of the melanocortin-1 receptor in regulating feather pigmentation in the chicken. *Biochim Biophys Acta* 1308, 164–168.

Theron E, Hawkins K, Bermingham E, Ricklefs RE and Mundy NI (2001) The molecular basis of an avian plumage polymorphism in the wild: a melanocortin-1-receptor point mutation is perfectly associated with the melanic plumage morph of the bananaquit, *Coereba flaveola*. *Curr Biol* 11, 550–557.

True JR (2003) Insect melanism: the molecules matter. *Trends Ecol Evolut*. 18: 640–647.

Trullas SC, van Wykb JH and Spotila JR (2007) Thermal melanism in ectotherms. *J Therm Biol* 32:235–245.

Vage DI, Klungland H, Lu D and Cone RD (1999) Molecular and pharmacological characterization of dominant black coat color in sheep. *Mamm Genome* 10:39–43.

Vage DI, Lu DS, Klungland H, Lien S, Adalsteinsson S and Cone RD (1997) A non-epistatic interaction of agouti and extension in the fox, *Vulpes vulpes*. *Nat Genet* 15:311–315.

Verrastro L and Krause L (1999) Ciclo reprodutivo de machos de *Liolaemus occipitalis* Boulenger (Sauria, Tropiduridae). *Rev Bras Zool* 16(1):227-231.

Verrastro L, Veronese L, Bujes C and Dias Filho MM (2003) A new species of *Liolaemus* from southern Brazil (Iguania, Tropiduridae). *Herpetology, Emporia*, 59(1):252-277.

Verrastro L, Schossler M and Silva, CM (2006) *Liolaemus occipitalis*. *Herpetological Review*, v. 37, p. 495.

Vidal O, Araguas RM, Fernández R, Heras S, Sanz N and Pla C (2010) Melanism in guinea fowl (*Numida meleagris*) is associated with a deletion of Phenylalanine-256 in the MC1R gene. *Anim Genet* DOI: 10.1111/j.1365-2052.2010.02056.x

Wlasiuk G and Nachman MW (2007) The Genetics of Adaptive Coat Color in Gophers: Coding Variation at Mc1r Is Not Responsible for Dorsal Color Differences. *J Hered* 98(6):567–574.

Zylinski S, Osorio D and Shohet AJ (2009) Perception of edges and visual texture in the camouflage of the common cuttlefish *Sepia officinalis*. *Phil Trans R Soc B*. 364: 439–448.