



UnB

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

Varição epigenética tecido específica em diferentes
populações da lagartixa invasora (*Hemidactylus mabouia*) no
Brasil

Marcus Paulo Marques Pereira

Brasília

04/2022



UnB

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

Varição epigenética tecido específica em diferentes
populações da lagartixa invasora (*Hemidactylus mabouia*) no

Brasil

Marcus Paulo Marques Pereira

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-graduação em
Zoologia, Instituto de Ciências
Biológicas, da Universidade de
Brasília, como parte dos requisitos
necessários à obtenção do título de
Mestre em Zoologia.

Orientadora: Lilian Gimenes Giugliano

Brasília

04/2022

Varição epigenética tecido específica em diferentes populações da lagartixa
invasora (*Hemidactylus mabouia*) no Brasil

Marcus Paulo Marques Pereira

Orientadora: Lilian Gimenes Giugliano

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós graduação em Zoologia,
Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília, como parte dos
requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Zoologia.

Aprovada por

Lilian Gimenes Giugliano, Orientadora – UnB

Fernando Pacheco Rodrigues – UnB

Helga Correa Wiederhecker – WWF Brasil

Julia Klaczko – UnB

Brasília

04/2022

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que de alguma forma contribuíram para a realização dessa dissertação.

Primeiramente, aos meus pais Marcio e Paula por todo o apoio ao longo da vida. Aos meus irmãos Pedro e Eduardo; a minha vó Dinha e aos meus tios que sempre me apoiaram nos meus estudos.

À professora Lilian, que me orienta desde o final da minha graduação. Agradeço a oportunidade e a mentoria ao longo desses anos.

Aos meus amigos, em especial aos que me acompanham nessa jornada pela biologia desde o primeiro semestre.

A todos do Laboratório de Genética e Biodiversidade que contribuíram de alguma maneira no dia-a-dia de trabalho, em particular o técnico Fred e o Áquila que me acompanhou e contribuiu para que a pesquisa fosse feita.

Por fim, gostaria de agradecer à CAPES, FAP-DF, ao Programa de Pós-graduação em Zoologia e à Universidade de Brasília pelo apoio financeiro e de estrutura para que essa dissertação fosse possível.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iv
SUMÁRIO.....	v
RESUMO.....	vii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO GERAL	1
o <i>Hemidactylus mabouia</i>	1
o Mecanismos epigenéticos	2
o Metilação do DNA, ecologia e invasão	4
o Objetivo	6
Variação epigenética tecido específica em diferentes populações da lagartixa invasora (<i>Hemidactylus mabouia</i>) no Brasil	7
INTRODUÇÃO	7
MATERIAL E MÉTODOS.....	10
o Amostras e extração do DNA	10
o MSAP	10
o Análise dos dados	11
RESULTADOS.....	13
o Variação epigenética	13
o Diferenciação tecidual	14
o Diferenciação populacional	14
o Variação, diferenciação e correlação genética	15
DISCUSSÃO.....	17
o Correlação genética	17
o Análise tecidual	18
o Análise populacional.....	19

o Conclusão e perspectivas futuras	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22
TABELAS.....	31
FIGURAS.....	35

RESUMO

Variação epigenética tecido específica em diferentes populações da lagartixa invasora (*Hemidactylus mabouia*) no Brasil

Marcus Paulo Marques Pereira

Orientadora: Lilian Gimenes Giugliano

Resumo da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zoologia, Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Título de Mestre em Zoologia.

A importância da epigenética para a evolução e a ecologia vem sendo cada vez mais discutida. A metilação do DNA é o mecanismo mais estudado e está correlacionado com plasticidade fenotípica, que é um dos fatores que podem contribuir com o sucesso de uma invasão biológica. Estudos vem mostrando que a metilação do DNA pode ter um papel importante em invasões, mas ainda relativamente pouco explorada em vertebrados. Utilizando o método de MSAP (*methylation-amplified fragments polymorphism*), foi levantada a metilação do DNA da lagartixa invasora (*Hemidactylus mabouia*) em populações de duas cidades brasileiras (Brasília e Salvador) com histórico de invasão distintos. Levando em conta as diferenças teciduais, a metilação foi avaliada em três tecidos distintos (cérebro, músculo e fígado). Brasília, cuja invasão é mais recente, apresentou maior diversidade que Salvador para todos os tecidos; esse resultado é similar a outros estudos que mostram um aumento da variação como uma assinatura no processo de invasão. A diferenciação epigenética entre as populações foi maior do que a diferenciação genética e mudou de acordo com o tecido. Além disso a distância genética só explicou parte da distância epigenética. Isso indica uma independência da metilação e a

atuação de possíveis fatores ambientais. Por fim, os resultados mostram que populações de uma lagartixa invasora apresentam perfis epigenéticos distintos, sendo essa diferença específica dependendo do tecido.

Palavras-chave: *Hemidactylus mabouia*, invasão biológica, epigenética, metilação do DNA, tecidos, MSAP

ABSTRACT

Varição epigenética tecido específica em diferentes populações da lagartixa invasora (*Hemidactylus mabouia*) no Brasil

Marcus Paulo Marques Pereira

Orientadora: Lilian Gimenes Giugliano

Abstract da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zoologia, Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Título de Mestre em Zoologia.

The relevance of epigenetics in evolution and ecology has been increasingly discussed. DNA methylation is the most studied mechanism and it's correlated to phenotypic plasticity, which is one of the factors that can contribute to a successful biological invasion. Studies have shown that DNA methylation may play an important role in invasions, but it still relatively unexplored in vertebrates. Using MSAP (*methylation-amplified fragments polymorphism*) method, we analyzed DNA methylation of the invasive house gecko (*Hemidactylus mabouia*) from two Brazilian populations (Brasília e Salvador) with different invasions histories. Taking into account the tissues differences, the methylation was screened in three distinct tissues (brain, muscle and liver). In Brasília population, whose invasion was more recent, showed greater epigenetic diversity than Salvador population for all tissues; this result is similar to other studies where an increased epigenetic variation is a signature in the invasion process. The epigenetic differentiation between populations was greater than the genetic differentiation and changed according to tissue. Furthermore, the genetic distance only explained part of the epigenetic distance. This indicates an independence of the methylation and the influence of possible environmental factors.

Furthermore, the results shows that populations of the invasive gecko have different epigenetics profiles with tissue specificity.

Key-words: *Hemidactylus mabouia*, biological invasion, epigenetics, DNA methylation, tissues, MSAP

Brasília
04/2022

INTRODUÇÃO GERAL

- *Hemidactylus mabouia*

A lagartixa de parede, *Hemidactylus mabouia* (Moreau de Jonnès, 1818), é um geconídeo invasor originário da região biogeográfica zambeziana da África (Agarwal et al., 2021; Carranza & Arnold, 2006) presente tanto em ambientes naturais quanto em habitações humanas, principalmente nas áreas invadidas (Kluge, 1969; Vanzolini et al., 1980). A linhagem invasora (*Hemidactylus mabouia* ss) seria apenas uma entre pelo menos 20 espécies do complexo *H. mabouia* que surgiu durante o Mioceno e a única que evoluiu traços para se tornar invasora (Agarwal et al., 2021). É uma espécie de hábitos noturnos e dieta generalista, alimentando-se de diversos grupos de artrópodes (Albuquerque et al., 2013; Rocha et al., 2002; Rocha & Anjos, 2007); sendo que a composição principal pode variar entre ambientes naturais (ex: ortópteros e aranhas) e antrópicos (ex: dípteros e himenópteros) devido a disponibilidade (Luciano Alves dos Anjos & Rocha, 2008; Rocha & Anjos, 2007).

Majoritariamente tropical, hoje a espécie está amplamente distribuída na África, América do Sul, Caribe e Flórida-EUA (Agarwal et al., 2021; Carranza & Arnold, 2006; Weterings & Vetter, 2018). Já existem registros da sua presença em outras partes dos Estados Unidos, Europa, sudeste asiático e norte da Austrália (Weterings & Vetter, 2018), sendo os dois últimos previstos como potenciais áreas de invasão nas condições ambientais atuais (Rödder et al., 2008; Weterings & Vetter, 2018). Mesmo com essa abrangência e continuada expansão, *H. mabouia* possui uma capacidade natural de dispersão limitada a pequenas escalas (Kristen Harfmann Short & Petren, 2011), tendo sua dispersão auxiliada pelo homem para que a espécie continue sua expansão terrestre em maiores escalas após a introdução (Kristen H. Short & Petren, 2011). Sobre sua introdução nas Américas, há muito tempo acredita-se que tenha ocorrido de forma recente junto com o tráfico negreiro (Vanzolini, 1968), sendo que uma chegada natural e mais antiga também já foi defendida baseada em características morfológicas (Kluge, 1969). Porém, estudos mais recentes mostrando uma baixíssima variação genética ao longo da sua ampla distribuição (Carranza & Arnold, 2006) e uma correlação com o fluxo de embarque e desembarque de navios

negreiros (Agarwal et al., 2021; Guimarães, 2019) suportam a hipótese de uma chegada rápida e recente mediada pelo ser humano. No Brasil, a espécie está presente em diversas áreas urbanas do país, mas também já há registros em áreas naturais (Anjos & Rocha, 2008; Telles et al., 2015), existindo dois agrupamentos genéticos regionais, sem diferença significativa na diversidade genética entre locais de introdução primária e secundária (F. P. Pontes, 2017).

Ao longo do seu processo de invasão, a lagartixa de parede tem encontrado diferentes lagartos como competidores nas regiões onde é introduzido (Rödder et al., 2008). Na Flórida, o congênere *Hemidactylus garnotii*, que havia sido introduzido na região há mais tempo, foi rapidamente deslocado com a chegada de *H. mabouia* (Kristen Harfmann Short & Petren, 2012). O mesmo acontece em Curaçao, onde a espécie nativa *Phyllodactylus martini* teve sua presença reduzida em construções onde costumava ser abundante para dar lugar a *H. mabouia* (Hughes et al., 2015) por exclusão competitiva e ocasionalmente predação (Dornburg et al., 2016). Porém, também há ocorrência da presença de *Hemidactylus mabouia* em simpatria com outros lagartos sem que efeitos negativos observados em Barbados (Williams et al., 2016) e no Brasil (Sousa et al., 2017; Winck et al., 2017).

Espécies invasoras enfrentam diversos desafios desde o transporte até o estabelecimento. Agarwal et al. (2021) levanta explicações para o sucesso na invasão que envolvem a capacidade do *H. mabouia* de aproveitar das condições de temperatura em micro habitats urbanos, o que já é discutido para outras espécies invasoras (Cadotte et al., 2017; Gaertner et al., 2017). Outro ponto seria a capacidade da espécie de mudar sua biologia termal (Agarwal et al., 2021).

○ *Mecanismos epigenéticos*

O conceito de epigenética foi mudando ao longo dos anos desde que surgiu no campo da biologia do desenvolvimento e usado de diferentes maneiras (Bird, 2007), sendo mais recentemente definida como o estudo de alterações herdáveis na expressão gênica que não envolvem alteração na sequência de DNA (Bossdorf et al., 2008; E. J. Richards, 2006). Conhecemos hoje diferentes mecanismos epigenéticos responsáveis pelas alterações na expressão gênica, como: a metilação

do DNA, modificações pós-traducionais em histonas, além da ação de RNAs não codantes (Bossdorf et al., 2008; Duncan et al., 2014).

A metilação do DNA é uma modificação comum em eucariotos, e envolve a modificação de uma base de DNA, mais frequentemente a quinta posição de uma citosina (5mC) em um par dinucleotídeo CpG, com a adição de um grupo metil afetando o enrolamento de DNA em torno de histonas e alterando o potencial ligação de fatores transcricionais (Duncan et al., 2014; Jones, 2012; E. J. Richards, 2006). Os mecanismos responsáveis pela adição, manutenção e remoção da metilação são fundamentais para a função, sendo as enzimas responsáveis pela inclusão de novas metilações e da propagação clonal conhecidas (Jones, 2012; E. J. Richards, 2006). A função mais conhecida da metilação é a diminuição da atividade gênica quando ela acontece na região promotora, mas pode exercer outras função ocorrendo em outras áreas do genoma (Jones, 2012).

Existe uma especificidade tecidual do conteúdo e padrão de 5mC em vertebrados (Bogdanović et al., 2012; Bogdanović & Veenstra, 2009; Ehrlich et al., 1982; Gama-Sosa et al., 1983; Zhou et al., 2017). O perfil de metilação encontrado no DNA de várias células são diferentes durante o desenvolvimento, sendo indicativas da diferenciação celular (Bogdanović et al., 2012; Bogdanović & Veenstra, 2009; Zhou et al., 2017). No entanto, o nível de 5mC no DNA pode variar em relação à atividade funcional da célula (Bogdanović et al., 2012; Bogdanović & Veenstra, 2009). O nível de metilação em animais varia entre as espécies, mantendo um padrão taxonômico (Vanyushin et al., 1970, 1973). A metilação do DNA em vertebrados ocorre por todo o genoma, enquanto que em invertebrados ele é mais restrito em algumas regiões (Tweedie et al., 1997). Dentro dos vertebrados existe maior variação dentro de determinadas espécies (Vanyushin et al., 1970), sendo que em peixes e anfíbios são cerca de duas vezes mais metilados que os dos outros grupos de vertebrados (Jabbari et al., 1997). O nível de metilação nos répteis é bastante variável, com valores próximos tanto a peixes quanto a mamíferos (Jabbari et al., 1997; Varriale & Bernardi, 2006). Dentre os répteis, a ordem Squamata é a que apresenta a maior variação, sendo que crocodilos e tartarugas possuem genoma menos metilados mesmo tendo tamanho maior (Varriale & Bernardi, 2006).

A metilação do DNA não está ligada apenas ao genoma e ao desenvolvimento, já sabemos hoje que ela é influenciada por fatores ambientais durante a vida dos indivíduos (Verhoeven et al., 2016). Além disso, essas mudanças podem ser herdadas

pelas próximas gerações (E. J. Richards, 2006). O quanto essas mudanças são transmitidas e estáveis ainda é incerto, sabe-se que em mamíferos como humanos e camundongos há uma reprogramação da metilação nos estágios iniciais de formação (Anastasiadi et al., 2021; Perez & Lehner, 2019). Porém, em outros vertebrados como peixe-zebra e sapos essa reprogramação é mais restrita (Anastasiadi et al., 2021; Skvortsova et al., 2018).

- *Metilação do DNA e ecologia*

O fato das marcações epigenéticas poderem ser afetadas pelo ambiente e serem herdáveis, levanta a questão sobre sua importância em estudos ecológicos e evolutivos (Bossdorf et al., 2008; Hawes, Fidler, et al., 2018; C. L. Richards, Bossdorf, & Verhoeven, 2010; Varriale, 2014). Bossdorf et al. (2008) discutem porque ecólogos devem se interessar por estudar a variação e a herança epigenética: (1) processos epigenéticos poderiam explicar algumas das variações fenotípicas hereditárias observadas em populações naturais que não podem ser explicadas por diferenças na sequência de DNA, (2) o estudo da epigenética fornecerá insights sobre os mecanismos que permitem que os organismos respondam ao ambiente (Fig. I).

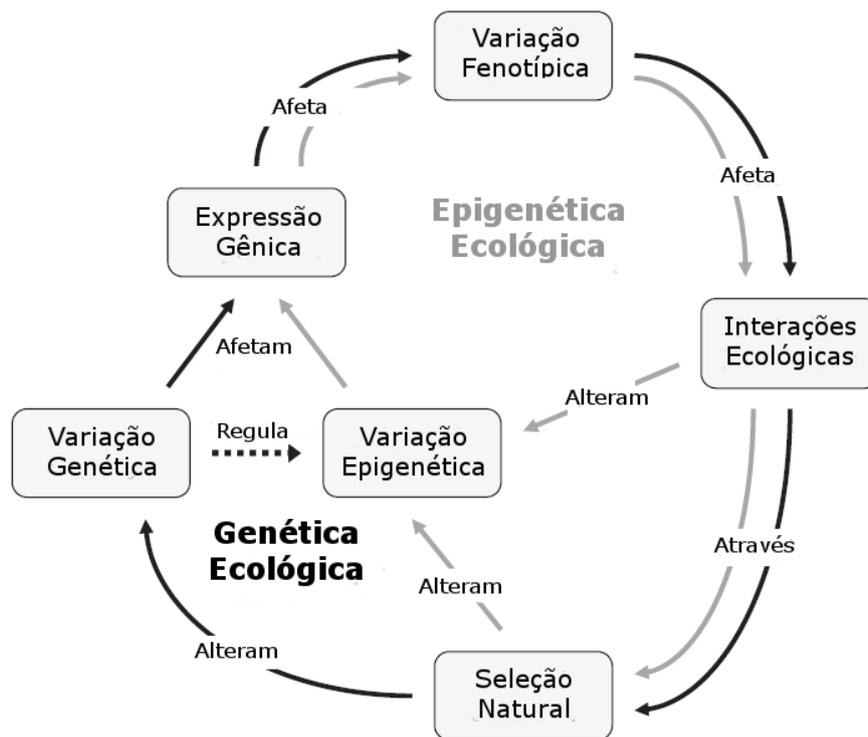


Figura I: Relações e efeitos da variação genética (linhas pretas) e epigenética (linhas cinzas). Traduzido de Bosssdorf et al. (2008).

A primeira etapa no estudo da epigenética em populações naturais é conhecer como suas marcações estão distribuídas, além de sua variação e estrutura dentro e entre diferentes populações. Richards (2006) dividiu a variação epigenética em três tipos, de acordo com sua relação com a variação genética: obrigatória, facilitada e pura. A primeira refere-se a uma variação dependente da variação genética, existindo uma correlação direta entre genótipo e epigenótipo. A variação facilitada ocorre de forma semi-independente onde o epigenótipo varia de maneira probabilística, mas apenas em contextos genótipos específicos. Já a pura mostra uma variação epigenética completamente independente da variação genética (E. J. Richards, 2006, 2008). As duas últimas podem apresentar um padrão de segregação não-mendeliana e serem afetadas tanto pelas condições ambientais quanto pela estocasticidade, podendo assim explicar variações fenotípicas não explicáveis apenas pela variação na sequência do DNA (Foust et al., 2015; C. L. Richards, Bosssdorf, & Verhoeven, 2010).

Após o trabalho de Bosssdorf et al. (2008), estudos em epigenética ecológica começaram a surgir, principalmente com o uso da técnica de 'Methylation sensitive

amplified polymorphism' (MSAP ou MS-AFLP), uma variação do AFLP genético. Por ser uma forma barata e eficiente de levantar variação na metilação do DNA em múltiplos loci, vem sendo usada para detectar variação epigenética em populações naturais (Schrey et al., 2013). Porém, a técnica tem suas limitações por ser um marcador dominante e mantendo os loci anônimos, não permitindo a ligação com a função dos mesmos no contexto do estudo (Schrey et al., 2013). Mais recentemente, técnicas utilizando sequenciamento com bissulfito vem surgindo. Elas permitam uma maior resolução, produzindo resultados para nucleotídeos individualmente. Esses novos protocolos procuram sequenciar apenas trechos do DNA, permitindo o barateamento da técnica e sua aplicação em animais não modelos (Paun et al., 2019; Robertson & Richards, 2015; Van Gurp et al., 2016).

- *Objetivo*

Levando em conta o sucesso na invasão de *Hemidactylus mabouia*, a lagartixa se torna um bom modelo de estudos para espécies invasoras. O objetivo dessa dissertação é começar a entender o possível papel de mecanismos epigenéticos em populações naturais da espécie. A proposta é analisar a variação da metilação do DNA em amostras de duas cidades brasileiras, Salvador e Brasília, com tempos de invasão distintos, também levando em conta as diferenças teciduais. Espera-se encontrar uma alta variação epigenética, além de uma diferença entre as cidades, com Brasília apresentando maior valor por ser um ponto mais recente. Além disso, cada tecido deve refletir de forma diferente essas diferenças populacionais.

Varição epigenética tecido específica em diferentes populações da lagartixa invasora (*Hemidactylus mabouia*) no Brasil

Marcus Paulo Marques Pereira¹ e Lilian Gimenes Giugliano²

¹ Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Departamento de Zoologia, Universidade de Brasília

² Departamento de Genética e Morfologia, Universidade de Brasília

INTRODUÇÃO

Espécies invasoras chamam atenção pelo impactos que pode causar, mas o processo que levam ao sucesso ou não de uma invasão nos permitem o estudo de evolução rápida e adaptação (Bock et al., 2015). Um dos principais pontos que muitas espécies enfrentam é o da baixa diversidade genética, podendo ser contornado, por exemplo, por múltiplas introduções (Bock et al., 2015; Estoup et al., 2016). A presença de diversidade genética é essencial para a adaptação de uma população frente ao ambiente, dessa forma, o sucesso na invasão e o estabelecimento de espécies invasoras que sofrem gargalos populacionais cria um paradoxo genético (Estoup et al., 2016). Fatores moleculares como hibridização ou poliploidia no caso de plantas, podem contribuir para mitigar a diminuição da variabilidade genética, bem como mutações ao longo do tempo (Bock et al., 2015). Outro fator molecular que pode nos ajudar a entender o sucesso de espécies invasoras são os mecanismos epigenéticos, que recentemente vem ganhando especial atenção (Hawes, Fidler, et al., 2018; Marin et al., 2020).

A epigenética se refere a alterações herdáveis na expressão gênica que não envolvem alteração na sequência de DNA (Bossdorf et al., 2008; E. J. Richards, 2006). A mais conhecida é a metilação do DNA que consiste na ligação de um grupo metil

em suas bases nitrogenadas, mais comumente a citosina (Jones, 2012). Ela é uma alteração herdável, presente em diversos organismos, mas cujo padrão e função pode variar de acordo com o táxon (Zemach et al., 2010). Ainda, a metilação do DNA pode ser influenciada diretamente pelo ambiente (C. L. Richards, Bosssdorf, & Verhoeven, 2010; E. J. Richards, 2006). Compreender a variação epigenética pode ser essencial para entender processos ecológicos e evolutivos, incluindo invasões biológicas (Bosssdorf et al., 2008; Verhoeven et al., 2016). Mecanismos epigenéticos podem contribuir para a variação fenotípica presente numa população para além do genótipo: uma variação epigenética parcial ou completamente independente da variação genética permite um que mesmo genótipo possa resultar em diferentes fenótipos (C. L. Richards, Bosssdorf, & Verhoeven, 2010; E. J. Richards, 2006). Além disso, a epigenética pode nos ajudar a entender como organismos reagem ao ambiente (Bosssdorf et al., 2008; E. J. Richards, 2008). Essa capacidade de mediar a relação genótipo x ambiente x fenótipo, a coloca como central para entender a plasticidade fenotípica (Duncan et al., 2014; C. L. Richards, Bosssdorf, & Pigliucci, 2010).

No caso especial das invasões, a metilação do DNA pode desempenhar um papel fundamental no sucesso da invasão já que as populações costumam enfrentar justamente uma redução na variação genética no momento em que a sua manutenção depende de se adaptar a novos ambientes. Um dos principais desafios é diferenciar o papel relativo da variação genética e epigenética, especialmente em espécies com reprodução sexuada. Já há estudos em diferentes espécies, porém a maioria ocorreu em plantas (Hawes, Fidler, et al., 2018; Marin et al., 2020), onde a facilidade de manipulação experimental e a utilização de espécies clonais já permitem observar os diferentes papéis que a metilação do DNA possui no processo de invasão, como a geração de variação fenotípica (Mounger et al., 2021). Trabalhos em animais são mais raros comparados a plantas. Em diferentes invertebrados marinhos, foi observada diferenciação epigenética entre populações, com a hipometilação na população invasora como característica (Ardura et al., 2017; Hawes et al., 2019). A metilação do DNA ainda se mostrou como forma de resposta rápida a mudanças no ambiente como na temperatura e salinidade (Ardura et al., 2018; Hawes, Tremblay, et al., 2018; Huang et al., 2017), com mudanças significativas em genes chaves para elas (Pu & Zhan, 2017). Já em vertebrados, a variação epigenética foi apontada como possível compensação para a baixa variação genética em diferentes introduções de *Passer domesticus* (Schrey et al., 2012). Em populações de *P. domesticus* do Quênia,

também foi encontrada uma correlação negativa entre a diversidade genética e epigenética (Liebl et al., 2013). A diversidade epigenética aumentava ao longo da área de expansão enquanto a diversidade genética diminuía (Liebl et al., 2013). Na mesma área, foi visto que a metilação do DNA está associada a expressão de gene do sistema imune (Kilvitis et al., 2019). Um estudo feito com populações na Austrália não achou a mesma correlação que os trabalhos anteriores, apontando a recuperação da diversidade genética como provável motivo (Sheldon et al., 2018).

A lagartixa de parede (*Hemidactylus mabouia*) é uma espécie invasora com distribuição ampla, bem como outras congêneres. O gênero *Hemidactylus* possui pelo menos 5 espécies com distribuição global, muitas vezes adaptando-se a ambientes antropizados como a própria *H. mabouia* (Carranza & Arnold, 2006; Weterings & Vetter, 2018). Hoje a espécie está amplamente distribuída na África, América do Sul, Caribe e no sudeste dos EUA (Carranza & Arnold, 2006; Weterings & Vetter, 2018). Nas Américas, sua chegada teria sido no período colonial por meio do tráfico negreiro (Agarwal et al., 2021; Guimarães, 2019). No Brasil, ela está presente em diferentes regiões em áreas urbanas, mas também há registro em áreas naturais (Luciano Alves dos Anjos & Rocha, 2008; F. P. Pontes, 2017). Esse sucesso em invadir e se adaptar em grande parte do mundo faz com que a espécie seja ótima modelo para os estudos de invasões biológicas (Agarwal et al., 2021).

Dessa forma, o presente trabalho se propõe a estudar a variação epigenética em populações naturais de *H. mabouia*. Usando a técnica do MSAP, uma ferramenta barata e aplicável para animais não-modelos, e dados de variação genética já levantados anteriormente, os objetivos do estudo são: (1) levantar a variação epigenética em duas populações com históricos de invasão distintos, (2) comparar o padrão de variação em diferentes tecidos de origem embrionário distintas e (3) avaliar como a variação genética e epigenética se correlacionam.

MATERIAL E MÉTODOS

○ *Amostras e extração do DNA*

Foram analisados ao todo 43 indivíduos de *Hemidactylus mabouia*, coletados em áreas urbanas de duas cidades diferentes: Brasília – DF (n = 21) e Salvador – BA (n = 22). A última foi uma das primeiras cidades do Brasil e porto de entrada para navios negreiros vindos da África, enquanto a primeira foi criada há menos de 70 anos. As coletas foram feitas anteriormente, entre 2014 e 2016, por integrantes grupo de pesquisa do Laboratório de Genética e Biodiversidade do Instituto de Biologia, Universidade de Brasília. Como a metilação pode mudar ao longo do desenvolvimento, apenas indivíduos considerados adultos (> 5 cm; L. A. Anjos and Rocha, 2008) foram usados.

Para considerar a variação tecidual, as amostras de DNA foram extraídas de três tecidos diferentes para todos os indivíduos: cérebro, músculo e fígado; sendo cada um de origem embrionária diferente (Edgar et al., 2013). A extração do DNA foi feita usando o kit de extração comercial Wizard Genomic DNA Purification, com uma concentração final de 100 ng/uL.

A utilização das lagartixas e os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso Animal da Universidade de Brasília (CEUA, UnBDoc no 46108/2014). Todas as amostras estão depositadas na coleção do Laboratório de Anatomia Comparativa dos Vertebrados (LACV) da Universidade de Brasília.

○ *MSAP*

A análise da metilação do DNA foi feita por meio da técnica MSAP (Methylation sensitive amplified polymorphism) que é uma alteração da técnica de AFLP na qual se utiliza enzimas de restrição isosquizômeras MspI e HpaII, no lugar da MseI (Reyna-López et al., 1997). Ambas as enzimas tem o mesmo sítio de clivagem 5'-CCGG-3', porém possuem sensibilidades diferentes em caso de metilação nas citosinas, fazendo com que diferentes perfis de metilação sejam observados (Tabela 1),

podendo ser não metilado (Tipo I), metilados (Tipo II e III) e não informativo (Tipo IV). O protocolo usado foi baseado no de Schulz, Eckstein e Durka (2013).

Para cada indivíduo, aproximadamente 500 ng de DNA extraído foi digerido a 37 °C/12 h e 90 °C/20 min, em reações paralelas com 0,3 U de EcoRI junto de 1,2 U de HpaII ou 0,6 de U MspI num volume final 15 µl complementados por 3 µl de 10x Buffer Tango e água milli-Q. Foram então ligados adaptadores (Tab. 2) à 127 ng do DNA digerido com 0,8 U de T4 ligase num volume total de 10 µl, sendo 0,06 µM de EcoRI e 0,3 µM HpaII/MspI. A reação foi feita à 22 °C/1 h e 70 °C/5 min.

Foram realizadas PCRs pré-seletivas para amplificar apenas os fragmentos onde houve ligação dos adaptadores. As reações foram feitas num volume total de contendo 20 µl, contendo 8 µl do resultado da ligação em diluição 1:2; 1,25 U de Taq polimerase (Go Taq G2 Hotstart, Promega) e 4 µl de tampão da Taq; 37,5 nM de MgCl₂ e 0,15 µM de dNTP; e 0,5 µM dos primers EcoRI+A e HpaII/MspI (Tab. 2). As reações foram feitas da seguinte forma: 94 °C por 2 min; 30 ciclos de 94 °C por 20 s, 56 °C por 30 s e 72 °C por 2 min; seguidos de 60 °C por 30 min.

Os resultados das PCRs pré-seletivas foram diluídos em 1:5 para realização de três PCRs seletivas para cada amostra. Três diferentes primers EcoRI, com marcações fluorescentes, foram usados em combinação com o primer Hpa/Msp+TCCA em reações paralelas (Tab. 2). As amplificações foram feitas em 2,5 µl de DNA pré-amplificado diluído em 1:5 em volumes totais de 10 µl com 1 U de Taq polimerase (Go Taq G2 Hotstart, Promega) e 2 µl de tampão da Taq; 37,5 nM de MgCl₂ e 0,2 µM de dNTP; e 0,25 µM de ambos os primers. As reações foram feitas da seguinte maneira: 94 °C por 2 min; 10 ciclos de 94 °C por 20 s, 66 °C por 30 s e 72 °C por 2 min; seguidos de 20 ciclos de 94 °C por 20 s, 56 °C 30 s e 72 °C por 2 min; finalizando com 60 °C por 30 min.

Os produtos da PCR foram enviados a EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia para leitura dos fragmentos usando o sequenciador automático ABI 3730.

○ *Análise dos dados*

Foi utilizado o PeakScanner v1.0 (Applied Biosystems) para identificação e seleção dos fragmentos que tinham sinal mínimo de 50rfu e tamanho entre 100 e

500pb. Em seguida a análise foi realizada no R v3.6.0 (R Core Team, 2019), dentro da IDE RStudio v1.4.1717 (RStudio Team, 2021). O pacote RawGeno 2.0-2 (Arrigo et al., 2012) foi usado para definir as bandas e criar a matriz binária para presença e ausência das mesmas. A matriz foi transformada de acordo com o Mixed Scoring 1 (Schulz et al., 2013), que consiste na utilização de dois conjuntos de marcadores chamados subepiloci. Nos subepiloci metilados (m-subepiloci), os tipos II e III são marcados como 1 enquanto os tipos I e IV como 0. Nos subepiloci não-metilados (u-subepiloci), o tipo I é marcado como 1 enquanto os outros como 0. Os Mixed Scoring, como propostos por Schulz et al. (2013), dão a possibilidade de diminuir a desvantagens de se analisar apenas fragmentos metilados ou não metilados, extraindo o máximo de informação possível. A escolha do Mixed Scoring 1 evita a possível ambiguidade entre os tipos II e III (Fulneček & Kovařík, 2014), além da metilação predominante em vertebrados ser na sequência CG (Fulneček & Kovařík, 2014; Zemach et al., 2010).

A matriz foi analisada usando o script do R “MSAP_calc” (Schulz et al., 2013) para parâmetros descritivos e índice de Shannon. Foram calculados o índice de diversidade de haplótipo e a distância epigenética par-a-par entre os grupos usando o programa GenALEx v6.5 (Peakall & Smouse, 2012). A diferenciação e a estrutura dos grupos foram analisadas por meio de AMOVA (Análise de Variância Molecular) e a variação epigenética entre os grupos por meio de PCoA (Análise das Coordenadas Principal), também usando o GenALEx.

Os dados genéticos de microssatélite foram retirados de trabalho anterior do laboratório (Pontes, 2017). Foram obtidos os dados brutos e utilizados os mesmos indivíduos da análise epigenética. AMOVA e PCoA foram refeitas apenas para os indivíduos aqui amostrados. Também foram feitos, dentro do GenALEx, testes de Mantel no nível de indivíduo a partir das matrizes de distância genética e epigenética.

RESULTADOS

Após a remoção dos indivíduos que não obtiveram sinal de qualidade e consistente no MSAP o número amostral ficou para Brasília: 18 amostras de cérebro, 17 de fígado e 18 de músculo; já para Salvador: 21 amostras de cérebro, 17 de fígado e 17 de músculo. Ao todo foram encontrados 785 fragmentos entre todos os grupos, somando as três combinações de primers.

○ *Varição epigenética*

A análise do MSAP, por meio do 'Mixed Scoring 1', resultou em 1508 epiloci divididos em 785 m-subepiloci e 723 n-subepiloci. Considerando o conjunto total de epiloci, o nível de polimorfismo variou de 51-90%, enquanto que para os subepiloci metilados e não-metilados a variação ficou entre 65-97% e 35-83%, respectivamente (Tabela 3). Em ambas as populações o músculo foi o que apresentou o maior índice de polimorfismo para todos os conjuntos de marcadores analisados. Para todos os tecidos, Brasília apresentou maior polimorfismo do que Salvador, sendo que fígado apresentou a maior diferença no valor do índice de diversidade entre as localidades.

Tanto no geral quanto nos subepiloci, o grupo de Brasília apresentou maior índice de diversidade de Shannon (I) e diversidade de haplótipo (h) em relação à Salvador quando comparado cada um dos tecidos (Tabela 3). Assim como no nível de polimorfismo, o músculo apresentou os maiores índices de diversidade seguido por cérebro. Fígado foi o tecido que apresentou maior diferença nos índices de diversidade entre as duas populações, principalmente no subepiloci não metilados. Não foram encontrados marcadores exclusivos no conjunto m-subepiloci. Nos u-subepiloci, Brasília apresentou maior número de marcadores exclusivos do que Salvador para todos os tecidos, sendo mais que o dobro e o triplo no fígado e cérebro, respectivamente, e cinco vezes mais no músculo.

○ *Diferenciação tecidual*

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) apresentou diferenciação epigenética entre os tecidos de uma mesma população para Brasília ($\Phi_{PT} = 0,067$; $p < 0,0001$) e Salvador ($\Phi_{PT} = 0,105$; $p < 0,0001$) (Tabela 4). Em ambos os casos, a maior parte da variação foi dentro dos tecidos do que entre eles. Quando analisados separadamente, os subepiloci também apresentaram diferenciação entre os tecidos para as duas populações, sendo que o u-subepiloci diferenciou mais os tecidos do que o m-subepiloci (Tabela 4).

Os resultados de diversidade e diferenciação epigenética descritos acima, podem ser observados pela Análise do Componentes Principais. Os tecidos apresentam grande sobreposição e pouco agrupamento definido nos indivíduos de Brasília (Fig. 1), enquanto que em Salvador a variação entre os indivíduos é baixa no fígado e nos outros tecidos é possível a formação de dois grupos (Fig. 2). Essa distribuição é possível de ser vista quando analisados os subepiloci juntos ou individualmente.

○ *Diferenciação populacional*

Foi encontrada diferenciação epigenética entre Brasília e Salvador para todos os tecidos analisados (Tabela 5), tendo fígado ($\Phi_{PT} = 0,258$; $p < 0,0001$) encontrado mais que o dobro que cérebro ($\Phi_{PT} = 0,150$; $p < 0,0001$) e músculo ($\Phi_{PT} = 0,117$; $p < 0,0001$). A análise para cada um dos subepiloci também encontrou diferenciação entre as populações para todos os tecidos, sendo que os m-subepiloci foi menor e u-subepiloci maior. Novamente, fígado foi o tecido que encontrou a maior diferenciação entre as populações.

A diferenciação entre populações considerando a totalidade dos epiloci encontrada no cérebro pode ser observada pela separação entre as populações principalmente no eixo 1 que corresponde 21,6% da variação total (Fig. 3A). Esse mesmo padrão pode ser observado quando os dois subepiloci são analisados separadamente sendo que no caso dos m-subepiloci o eixo 1 corresponde a 18,09% da variação (Fig. 3B) e nos u-subepiloci a 28,08% da variação (Fig. 3C). Quanto a

variação intra-populacional, Brasília apresenta maior variação que pode ser observada principalmente no eixo 1 nos três conjuntos de dados. No eixo 2 se destaca a variação intra-populacional de Salvador em todos os conjuntos de dados analisados.

O fígado, onde encontramos a maior diferenciação epigenética e maiores índices de diversidade, foi o tecido no qual a PCoA demonstrou mais claramente esses resultados. Foi o tecido no qual os dois primeiros eixos apresentaram a maior representação da variação. Para todos os grupos de marcadores é possível ver a separação das populações no primeiro eixo (Fig. 4). Salvador possui um agrupamento bem definido com pouca diferenciação intrapopulacional, enquanto em Brasília eles estão mais dispersos com a diferenciação entre os indivíduos representados principalmente no primeiro eixo, mas também no segundo.

Já músculo, que apresentou os maiores índices de diversidade, as populações se separaram no eixo 1, enquanto que a variação intrapopulacional ficou tanto no primeiro como no segundo eixo (Fig. 5). Em Salvador há a formação de dois agrupamentos que se separam nos dois eixos principais em todos os conjuntos (eixo 1: 19,43-34,57%; eixo 2: 11,49-22,21%): um mais agrupado e separado de Brasília e outro menor, porém mais disperso se sobrepondo à outra população. Em Brasília, a maior diversidade epigenética do músculo é melhor distribuída, mas também é possível ver separação intrapopulacional no segundo eixo, principalmente quando analisado apenas o u-subepiloci (Fig. 5C).

○ *Variação, diferenciação e correlação genética*

A diversidade genética de Salvador e Brasília foram similares tanto para o Índice de Shannon ($I = 1,354 \pm 0,091$; $I = 1,311 \pm 0,152$; respectivamente) quanto para heterozigosidade esperada ($He: 0,647 \pm 0,034$; $He: 0,638 \pm 0,059$). Foi encontrada diferenciação significativa entre as populações ($\Phi_{PT} = 0,178$, $p < 0,001$), porém a maior parte da variação foi entre indivíduos (82,18%) e não entre populações (17,82%). A distância epigenética dos três tecidos foi positivamente correlacionada com a distância genética a nível de indivíduo, considerando ambas as populações (Tabela 6). Analisando apenas Salvador, o cérebro apresentou correlação negativa, enquanto que o fígado apresentou correlação positiva para os marcadores metilados e mistos. Já o músculo apresentou correlação positiva significativa apenas para os conjuntos

de marcadores metilados. Para os indivíduos de Brasília não foi encontrado correlação estatisticamente significativa para nenhum tecido com nenhum conjunto de marcador.

DISCUSSÃO

No presente trabalho foi analisada a variação epigenética da lagartixa de parede, um geconídeo urbano invasor comum, a partir de amostras de duas cidades do Brasil com diferentes tempos de invasão e grupos genéticos. Além disso, levando em conta as diferenças epigenéticas teciduais, foram analisados materiais do cérebro, músculo e fígado. Os resultados mostraram uma diferenciação tanto nas populações quanto nos tecidos. Como esperado, esse padrão pode ser explicado parcialmente, mas não todo, pela variação genética. Ao se utilizar o 'Mixed Scoring 1', foi possível avaliar se essas diferenças estavam mais associadas à metilação ou à não-metilação.

○ *Correlação genética*

As duas populações amostradas pertencem a grupos genéticos diferentes (F. P. Pontes, 2017), e sabendo que variação genética influencia na variação epigenética (E. J. Richards, 2006, 2008) foram reutilizados dados já levantados anteriormente para os indivíduos aqui estudados. A variação para Salvador e Brasília já mostrada por Pontes (2017), e aqui reanalisados, confirmam a diferenciação genética entre as duas populações. Aqui, foi observado que a diferenciação epigenética foi maior do que a genética. Quando comparados o polimorfismo e índice de Shannon, a variação genética foi maior do que a variação epigenética para todos os tecidos, ainda assim, os marcadores usados foram diferentes. Enquanto que a variação genética foi similar para as duas populações, a variação epigenética foi maior em Brasília em relação a Salvador. Uma maior variação epigenética já foi reportada na expansão de outras espécies invasoras, sendo colocada como uma fonte adicional de variação e plasticidade fenotípica (Chwedorzewska & Bednarek, 2012; Liebl et al., 2013; Schrey et al., 2012). Uma possível explicação é a influência de fatores ambientais atuando e/ou epimutações estocásticas. Isso é reforçado pelos resultados de correlação significativas entre a distâncias genética e epigenética apenas em Salvador. Além disso, cada tecido respondeu de maneira diferente. Por exemplo, cérebro apresentou uma correlação negativa para os indivíduos de Salvador, enquanto que os outros dois

apresentaram correlação positiva para subepiloci metilados. Isso corrobora o fato de que variação genética consegue explicar parte, mas não toda a variação epigenética (E. J. Richards, 2006).

- *Análise tecidual*

Enquanto que todas as células do corpo apresentam o mesmo material genético, o padrão epigenético é diferente entre tecidos estando relacionado com a diferenciação celular. Dessa forma, assim como esperado e visto em outros estudos em populações naturais usando o mesmo método (Massicotte et al., 2011; Morán & Pérez-Figueroa, 2011; Yang et al., 2018), os resultados mostraram que os três tecidos aqui estudados: cérebro, músculo e fígado exibiram diferentes níveis de diversidade, sendo músculo o mais diverso nas duas populações amostradas. Em Brasília, o segundo tecido mais diverso foi fígado e o último cérebro, já em Salvador foi o inverso. A diferenciação tecidual foi mostrada pela AMOVA, sendo maior quando analisada apenas os marcadores não-metilados e menor quando apenas os metilados. Esse resultado por se dar pelo fato de que a metilação é comumente associada com um fator de repressão da transcrição (Jones, 2012), dessa forma os tecidos se assemelhavam mais nos loci onde genes não necessários para suas funções são reprimidos e menos onde genes relacionados as suas funções estão ativados.

A maior parte dos estudos em epigenética populacional usa apenas um tecido para análise, na maioria das vezes o sangue é utilizado por não precisar eutanasiar o animal (Husby, 2020). Porém, o padrão encontrado no sangue pode não refletir o de outros tecidos ao se analisar loci de significância funcional (Husby, 2020). O músculo, por exemplo, já usado em outros estudos com vertebrados (Liu et al., 2012; Massicotte et al., 2011; Massicotte & Angers, 2012; Riyahi et al., 2017; Yang et al., 2018), foi o que teve maior índices de diversidade e capturou a maior variação individual, mas em contrapartida teve o menor índice de diferenciação populacional. Uma alta variação individual também foi encontrada em peixes clonais (Massicotte et al., 2011; Massicotte & Angers, 2012), morcegos (Liu et al., 2012) e aves (Riyahi et al., 2017); bem como diferenciações populacionais e de subespécie. O cérebro, que aqui obteve diversidade próxima ao músculo quando olhando os m-subepiloci, teve nível de diversidade igual ao fígado em trutas, também diferenciando estágios diferentes de

maturação (Morán & Pérez-Figueroa, 2011). Em *Podarcis muralis*, outro lagarto invasor, baixas temperaturas de incubação levam a uma hipometilação no cérebro junto com outras deficiências no desenvolvimento (Paredes et al., 2016).

Em contrapartida, analisando apenas o fígado veríamos que uma diferença maior nos índices de diversidade entre as duas cidades e uma maior diferenciação. No trabalho de Moran & Pérez-Figueroa (2011), não foi encontrada diferenciação epigenética populacional nem por período de maturação significativa em trutas similares geneticamente, enquanto que no lagópode-escocês, não só houve diferenciação populacional como foram encontrados epiloci específicos associadas à carga parasitária (Wenzel & Piertney, 2014). Já em espécies invasoras, a variação epigenética no fígado foi relacionada a expressão de gene do sistema imune em uma espécie em expansão de pardal e metilação diferencial em genes ligados a adaptação em populações de *Anolis sagrei* recém introduzidas (Juntao Hu et al., 2019). Em *Anolis cristatellus*, foi observado que a diferenciação epigenética está relacionada a isolamento ambiental independente da estrutura genética (Wogan et al., 2020).

Dessa forma, vemos que os três tecidos aqui usados já foram utilizados em outros estudos em diferentes animais em diferentes contextos. Todos conseguiram diferenciar populações e/ou estarem relacionados a questões ecológicas distintas. Os resultados aqui confirmam que a variação epigenética, ao contrário da genética, não é uniforme em todas as linhagens celulares. Uma abordagem que não leva em conta mais de um tecido poderia ter compreensão e interpretação limitada da variação epigenética (Husby, 2020). Além disso, dependendo da pergunta a ser procurada, o tecido a ser amostrado pode ter importância fundamental para as respostas.

○ *Análise populacional*

As duas populações estudadas apresentaram diferentes níveis de diversidade e estruturação epigenética, sendo que essa diferença variou de acordo com o tecido analisado. Diferenças epigenéticas entre populações já foram observadas em diferentes espécies invasoras, associando o seu papel no sucesso das mesmas. A maior parte dos estudos vem de plantas (Mounger et al., 2021); mas também existe em invertebrados (Ardura et al., 2017, 2018; Hawes et al., 2019; Huang et al., 2017) e vertebrados (Alonso et al., 2015; J. Hu & Barrett, 2017; Kilvitis et al., 2019; Liebl et al.,

2013; Schrey et al., 2012; Sheldon et al., 2018). Nos últimos anos, vem sendo discutido que a metilação do DNA pode exercer um papel no sucesso de espécies invasoras (Hawes, Fidler, et al., 2018; Marin et al., 2020). Uma maior diversidade epigenética pode contribuir para a variação fenotípica e, em casos de populações com baixa ou nenhuma diversidade genética, servir de mecanismo de plasticidade num modelo de 'genótipo de propósito geral' (Massicotte & Angers, 2012). Por ser influenciada pelo ambiente, a variação epigenética pode ser uma resposta aos fatores de estresse que uma espécie invasora passa durante o processo de invasão.

No atual estudo, para todos os tecidos, o grupo de Brasília apresentou uma maior variação epigenética do que Salvador. Como já visto, a distância genética explicou parte da distância epigenética diferentemente para cada tecido em Salvador e para as duas cidades juntas. Esse resultado mostra que apesar da influência genética, a variação epigenética, principalmente em Brasília, possui uma independência. O resto da variação pode ser explicada tanto por epimutações estocásticas que ocorreram nas duas populações, quanto pela influência ambiental de diferenças entre as duas cidades (C. L. Richards, Bossdorf, & Verhoeven, 2010; E. J. Richards, 2006). A maior variação epigenética no grupo de invasão mais recente se junta a outros trabalhos e reforça essa característica como uma assinatura para populações invasoras (Ardura et al., 2017; Chwedorzewska & Bednarek, 2012; Liebl et al., 2013; Schrey et al., 2016). A alta variação epigenética pode estar agindo como uma fonte de variação e plasticidade, além de um mecanismo de resposta aos fatores ambientais enfrentados pelas lagartixas.

Assim como na diferenciação entre os tecidos, o subconjunto de marcadores não-metilados separou melhor as populações do que o subconjunto dos metilados para os três tecidos. Isso significa que as populações se parecem mais pelos loci metilados em comum e se distinguem mais nos loci onde a metilação está ausente. Novamente, esse fator pode estar relacionado com um desmetilação em Brasília associada a um aumento na transcrição ou metilação em Salvador associada a repressão causada por pressões ambientais distintas (Ardura et al., 2018; Hawes, Tremblay, et al., 2018; Pu & Zhan, 2017).

A epigenética em pesquisas populacionais e ecológicas é relativamente recente como uma área de estudo, que vem crescendo nos últimos anos com o surgimento de novas metodologias (Bossdorf et al., 2008; Verhoeven et al., 2016). Tendo como fonte de variação tanto a sequência genética quanto fatores ecológicos, a capacidade

de mecanismos epigenéticos afetarem a expressão gênica nos possibilita entender mais a relação entre genótipo, fenótipo e ambiente. Bossdorf et al. (2008) colocam quatro questões fundamentais para a epigenética ecológica, sendo a primeira respondida nesse trabalho para a lagartixa de parede: qual a extensão e a estrutura da variação epigenética em populações naturais. Ainda foi possível explorar essa pergunta para diferentes tecidos, questão normalmente negligenciada por questões práticas.

○ *Conclusão e perspectivas futuras*

Com crescente entendimento e utilização de mecanismos epigenéticos para responder perguntas associadas a ecologia e evolução, saber o quanto a variação epigenética está presente e distribuídas é essencial para entender questões mais complexas. A área de biologia da invasão é uma que desperta especial atenção pelo fato de espécies invasoras possibilitarem observar processos de adaptação e resposta ao ambiente relativamente rápidos. Aqui, foi demonstrado que a lagartixa de parede, um geconídeo com populações invasoras amplamente distribuídas, possui uma alta variação epigenética com padrão diferente para cidades com tempo de invasão diferentes no Brasil. Esse resultado corrobora a literatura crescente de que a epigenética vem sendo associada ao sucesso da invasão. O fato de a distância genética explicar apenas parte variação na metilação do DNA, reforça a atuação de fatores ambientais sobre a variação epigenética. Ainda foi possível constatar que essas diferenças são tecido-específicas. Pouco explorada, a variação tecidual pode estar relacionada a função de cada tipo celular e a forma como eles respondem em cada população. A inclusão de mais populações já amostradas e a utilização de dados ambientais permitirá que a influência do tempo de invasão e características ecológicas. Além disso, o posterior uso de novas técnicas de sequenciamento possibilitará que mudanças em genes de interesse funcional sejam descobertas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarwal, I., Ceríaco, L. M. P., Metallinou, M., Jackman, T. R., & Bauer, A. M. (2021). How the African house gecko (*Hemidactylus mabouia*) conquered the world. *Royal Society Open Science*, 8(8). <https://doi.org/10.1098/rsos.210749>
- Albuquerque, N. R. De, Costa-Urquiza, A. da S., Soares, M. P., Alves, L. S., & Urquiza, M. V. S. (2013). Diet of two sit-and-wait lizards, *Phyllopezus pollicaris* (Spix, 1825) (Phyllodactylidae) and *Hemidactylus mabouia* (Moreau de Jonnès, 1818) (Gekkonidae) in a perianthropic area of Mato Grosso do Sul, western Brazil. *Biota Neotropica*, 13(4).
- Alonso, C., Pérez, R., Bazaga, P., & Herrera, C. M. (2015). Global DNA cytosine methylation as an evolving trait: Phylogenetic signal and correlated evolution with genome size in angiosperms. *Frontiers in Genetics*, 5(JAN), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00004>
- Anastasiadi, D., Venney, C. J., Bernatchez, L., & Wellenreuther, M. (2021). Epigenetic inheritance and reproductive mode in plants and animals. *Trends in Ecology and Evolution*, 36(12), 1124–1140. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2021.08.006>
- Anjos, Luciano Alves dos, & Rocha, C. F. D. (2008). A Lagartixa *Hemidactylus mabouia* Moreau de Jonnes, 1818 (Gekkonidae): uma espécie exótica e invasora amplamente estabelecida no Brasil. *Natureza & Conservação*, 6(1), 78–89.
- Anjos, Luciano A., & Rocha, C. F. D. (2008). Reproductive ecology of the invader species gekkonid lizard *Hemidactylus mabouia* in an area of southeastern Brazil. *Iheringia - Serie Zoologia*, 98(2), 205–209. <https://doi.org/10.1590/S0073-47212008000200006>
- Ardura, A., Clusa, L., Zaiko, A., Garcia-Vazquez, E., & Miralles, L. (2018). Stress related epigenetic changes may explain opportunistic success in biological invasions in Antipode mussels. *Scientific Reports*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29181-4>
- Ardura, A., Zaiko, A., Morán, P., Planes, S., & Garcia-Vazquez, E. (2017). Epigenetic signatures of invasive status in populations of marine invertebrates. *Scientific Reports*, 7(February), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep42193>
- Arrigo, N., Holderegger, R., & Alvarez, N. (2012). Automated scoring of AFLPs using RawGeno v 2.0, a free R CRAN library. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 888, 155–175. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-870-2_10
- Bird, A. (2007). Perceptions of epigenetics. *Nature*, 447(7143), 396–398. <https://doi.org/10.1038/nature05913>

- Bock, D. G., Caseys, C., Cousens, R. D., Hahn, M. A., Heredia, S. M., Hübner, S., Turner, K. G., Whitney, K. D., & Rieseberg, L. H. (2015). What we still don't know about invasion genetics. *Molecular Ecology*, *24*(9), 2277–2297. <https://doi.org/10.1111/mec.13032>
- Bogdanović, O., van Heeringen, S. J., & Veenstra, G. J. C. (2012). The epigenome in early vertebrate development. *Genesis*, *50*(3), 192–206. <https://doi.org/10.1002/dvg.20831>
- Bogdanović, O., & Veenstra, G. J. C. (2009). DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: Developmental requirements and function. *Chromosoma*, *118*(5), 549–565. <https://doi.org/10.1007/s00412-009-0221-9>
- Bossdorf, O., Richards, C. L., & Pigliucci, M. (2008). Epigenetics for ecologists. *Ecology Letters*, *11*(2), 106–115. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2007.01130.x>
- Cadotte, M. W., Yasui, S. L. E., Livingstone, S., & MacIvor, J. S. (2017). Are urban systems beneficial, detrimental, or indifferent for biological invasion? *Biological Invasions*, *19*(12), 3489–3503. <https://doi.org/10.1007/s10530-017-1586-y>
- Carranza, S., & Arnold, E. N. (2006). Systematics, biogeography, and evolution of Hemidactylus geckos (Reptilia: Gekkonidae) elucidated using mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *38*(2), 531–545. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2005.07.012>
- Chwedorzewska, K. J., & Bednarek, P. T. (2012). Genetic and epigenetic variation in a cosmopolitan grass *Poa annua* from Antarctic and Polish populations. *Polish Polar Research*, *33*(1), 63–80. <https://doi.org/10.2478/v10183-012-0004-5>
- Dornburg, A., Lippi, C., Federman, S., Moore, J. A., Warren, D. L., Iglesias, T. L., Brandley, M. C., Watkins-Colwell, G. J., Lamb, A. D., & Jones, A. (2016). Disentangling the Influence of Urbanization and Invasion on Endemic Geckos in Tropical Biodiversity Hot Spots: A Case Study of Phyllodactylus martini (Squamata: Phyllodactylidae) along an Urban Gradient in Curaçao. *Bulletin of the Peabody Museum of Natural History*, *57*(2), 147–164. <https://doi.org/10.3374/014.057.0209>
- Duncan, E. J., Gluckman, P. D., & Dearden, P. K. (2014). Epigenetics, plasticity, and evolution: How do we link epigenetic change to phenotype? *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, *322*(4), 208–220. <https://doi.org/10.1002/jez.b.22571>
- Edgar, R., Mazor, Y., Rinon, A., Blumenthal, J., Golan, Y., Buzhor, E., Livnat, I., Ben-Ari, S., Lieder, I., Shitrit, A., Gilboa, Y., Ben-Yehudah, A., Edri, O., Shraga, N., Bogoch, Y., Leshansky, L., Aharoni, S., West, M. D., Warshawsky, D., & Shtrichman, R. (2013). LifeMap Discovery™: The Embryonic Development, Stem

Cells, and Regenerative Medicine Research Portal. *PLoS ONE*, 8(7).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066629>

Ehrlich, M., Gama-Sosa, M. A., Huang, L. H., Midgett, R. M., Kuo, K. C., Mccune, R. A., & Gehrke, C. (1982). Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues or cells. *Nucleic Acids Research*, 10(8), 2709–2721. <https://doi.org/10.1093/nar/10.8.2709>

Estoup, A., Ravigne, V., Hufbauer, R., Vitalis, R., Gautier, M., & Facon, B. (2016). Is There A Genetic Paradox of Biological Invasion? *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 47(July), 51–72. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-121415>

Foust, C. M., Schrey, A. W., & Richards, C. L. (2015). Population Epigenetics. In O. Pontes & H. Jin (Eds.), *Nuclear Functions in Plant Transcription, Signaling and Development* (pp. 1–182). <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2386-1>

Fulneček, J., & Kovařík, A. (2014). How to interpret Methylation Sensitive Amplified Polymorphism (MSAP) profiles? *BMC Genetics*, 15. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-15-2>

Gaertner, M., Wilson, J. R. U., Cadotte, M. W., MacIvor, J. S., Zenni, R. D., & Richardson, D. M. (2017). Non-native species in urban environments: patterns, processes, impacts and challenges. *Biological Invasions*, 19(12), 3461–3469. <https://doi.org/10.1007/s10530-017-1598-7>

Gama-Sosa, M. A., Midgett, R. M., Slagel, V. A., Githens, S., Kuo, K. C., Gehrke, C. W., & Ehrlich, M. (1983). Tissue-specific differences in DNA methylation in various mammals. *BBA - Gene Structure and Expression*, 740(2), 212–219. [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(83\)90079-9](https://doi.org/10.1016/0167-4781(83)90079-9)

Guimarães, V. H. S. (2019). *A influência dos navios negreiros na invasão de Hemidactylus mabouia e Hemidactylus angulatus no continente americano eo efeito da dinâmica de nicho na atual distribuição das espécies*. Universidade de Brasília.

Hawes, N. A., Amadorou, A., Tremblay, L. A., Pochon, X., Dunphy, B., Fidler, A. E., & Smith, K. F. (2019). Epigenetic patterns associated with an ascidian invasion: a comparison of closely related clades in their native and introduced ranges. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49813-7>

Hawes, N. A., Fidler, A. E., Tremblay, L. A., Pochon, X., Dunphy, B. J., & Smith, K. F. (2018). Understanding the role of DNA methylation in successful biological invasions: a review. *Biological Invasions*, 20(9), 2285–2300. <https://doi.org/10.1007/s10530-018-1703-6>

Hawes, N. A., Tremblay, L. A., Pochon, X., Dunphy, B., Fidler, A. E., & Smith, K. F.

- (2018). Effects of temperature and salinity stress on DNA methylation in a highly invasive marine invertebrate, the colonial ascidian *Didemnum vexillum*. *PeerJ*, 2018(6), 1–18. <https://doi.org/10.7717/peerj.5003>
- Hu, J., & Barrett, R. D. H. (2017). Epigenetics in natural animal populations. *Journal of Evolutionary Biology*, 30(9), 1612–1632. <https://doi.org/10.1111/jeb.13130>
- Hu, Juntao, Askary, A. M., Thurman, T. J., Spiller, D. A., Palmer, T. M., Pringle, R. M., Barrett, R. D. H., & Pal, C. (2019). The Epigenetic Signature of Colonizing New Environments in *Anolis* Lizards. *Molecular Biology and Evolution*, 36(10), 2165–2170. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz133>
- Huang, X., Li, S., Ni, P., Gao, Y., Jiang, B., Zhou, Z., & Zhan, A. (2017). Rapid response to changing environments during biological invasions: DNA methylation perspectives. *Molecular Ecology*, 26(23), 6621–6633. <https://doi.org/10.1111/mec.14382>
- Hughes, D. F., Meshaka, W. E., & van Buurt, G. (2015). The Superior Colonizing Gecko *Hemidactylus mabouia* on Curaçao: Conservation Implications for the Native Gecko *Phyllodactylus martini*. *Journal of Herpetology*, 49(1), 60–63. <https://doi.org/10.1670/13-161>
- Husby, A. (2020). On the use of blood samples for measuring DNA methylation in ecological epigenetic studies. *Integrative and Comparative Biology*, 60(6), 1558–1566. <https://doi.org/10.1093/icb/icaa123>
- Jabbari, K., Cacciò, S., Païs De Barros, J. P., Desgrès, J., & Bernardi, G. (1997). Evolutionary changes in CpG and methylation levels in the genome of vertebrates. *Gene*, 205(1–2), 109–118. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(97\)00475-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(97)00475-7)
- Jones, P. A. (2012). Functions of DNA methylation: Islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 13(7), 484–492. <https://doi.org/10.1038/nrg3230>
- Kilvitis, H. J., Schrey, A. W., Ragsdale, A. K., Berrio, A., Phelps, S. M., & Martin, L. B. (2019). DNA methylation predicts immune gene expression in introduced house sparrows *Passer domesticus*. *Journal of Avian Biology*, 50(6), 1–10. <https://doi.org/10.1111/jav.01965>
- Kluge, A. G. (1969). The evolution and geographical origin of the New World *Hemidactylus mabouia-brookii* complex (Gekkonidae, Sauria). *Miscellaneous Publications of the Museum of Zoology, University of Michigan*, 138(138), 1–78.
- Liebl, A. L., Schrey, A. W., Richards, C. L., & Martin, L. B. (2013). Patterns of DNA methylation throughout a range expansion of an introduced songbird. *Integrative and Comparative Biology*, 53(2), 351–358. <https://doi.org/10.1093/icb/ict007>

- Liu, S., Sun, K., Jiang, T., Ho, J. P., Liu, B., & Feng, J. (2012). Natural Epigenetic variation in the female great roundleaf bat (*Hipposideros armiger*) populations. *Molecular Genetics and Genomics*, 287(8), 643–650. <https://doi.org/10.1007/s00438-012-0704-x>
- Marin, P., Genitoni, J., Barloy, D., Maury, S., Gibert, P., Ghalambor, C. K., & Vieira, C. (2020). Biological invasion: The influence of the hidden side of the (epi)genome. *Functional Ecology*, 34(2), 385–400. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13317>
- Massicotte, R., & Angers, B. (2012). General-Purpose Genotype or How Epigenetics Extend the Flexibility of a Genotype. *Genetics Research International*, 2012, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2012/317175>
- Massicotte, R., Whitelaw, E., & Angers, B. (2011). DNA methylation: A source of random variation in natural populations. *Epigenetics*, 6(4), 422–428. <https://doi.org/10.4161/epi.6.4.14532>
- Morán, P., & Pérez-Figueroa, A. (2011). Methylation changes associated with early maturation stages in the Atlantic salmon. *BMC Genetics*, 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-12-86>
- Mounger, J., Ainouche, M. L., Bossdorf, O., Cavé-Radet, A., Li, B., Parepa, M., Salmon, A., Yang, J., & Richards, C. L. (2021). Epigenetics and the success of invasive plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 376(1826). <https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0117>
- Paredes, U., Radersma, R., Cannell, N., While, G. M., & Uller, T. (2016). Low Incubation Temperature Induces DNA Hypomethylation in Lizard Brains. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 325(6), 390–395. <https://doi.org/10.1002/jez.2024>
- Paun, O., Verhoeven, K. J. F., & Richards, C. L. (2019). Opportunities and limitations of reduced representation bisulfite sequencing in plant ecological epigenomics. *New Phytologist*, 221(2), 738–742. <https://doi.org/10.1111/nph.15388>
- Peakall, R., & Smouse, P. E. (2012). GenALEX 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, 28(19), 2537–2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
- Perez, M. F., & Lehner, B. (2019). Intergenerational and transgenerational epigenetic inheritance in animals. *Nature Cell Biology*, 21(2), 143–151. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0242-9>
- Pontes, F. P. (2017). *Biologia da invasão de Hemidactylus mabouia no Brasil: análise da estrutura genética populacional*. Universidade de Brasília.
- Pu, C., & Zhan, A. (2017). Epigenetic divergence of key genes associated with water

- temperature and salinity in a highly invasive model ascidian. *Biological Invasions*, 19(7), 2015–2028. <https://doi.org/10.1007/s10530-017-1409-1>
- R Core Team. (2019). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. <https://www.r-project.org/>
- Richards, C. L., Bossdorf, O., & Pigliucci, M. (2010). What Role Does Heritable Epigenetic Variation Play in Phenotypic Evolution? *BioScience*, 60(3), 232–237. <https://doi.org/10.1525/bio.2010.60.3.9>
- Richards, C. L., Bossdorf, O., & Verhoeven, K. J. F. (2010). Understanding natural epigenetic variation. *New Phytologist*, 187(3), 562–564. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03369.x>
- Richards, E. J. (2006). Inheritance epigenetics variation - revisiting soft inheritance. *Nature Reviews Genetics*, 7(May), 395–402.
- Richards, E. J. (2008). Population epigenetics. *Current Opinion in Genetics and Development*, 18(2), 221–226. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2008.01.014>
- Riyahi, S., Vilatersana, R., Schrey, A. W., Node, H. G., Aliabadian, M., & Senar, J. C. (2017). Natural epigenetic variation within and among six subspecies of the house sparrow, *Passer domesticus*. *Journal of Experimental Biology*, 220(21), 4016–4023. <https://doi.org/10.1242/jeb.169268>
- Robertson, M., & Richards, C. (2015). Opportunities and challenges of next-generation sequencing applications in ecological epigenetics. *Molecular Ecology*, 24(15), 3799–3801. <https://doi.org/10.1111/mec.13277>
- Rocha, C. F. D., & Anjos, L. A. (2007). Feeding ecology of a nocturnal invasive alien lizard species, *Hemidactylus mabouia* Moreau de Jonnès, 1818 (Gekkonidae), living in an outcrop rocky area in southeastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 67(3), 485–491. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842007000300013>
- Rocha, C. F. D., Dutra, G. F., Vrcibradic, D., & Menezes, V. A. (2002). The terrestrial reptile fauna of the Abrolhos archipelago: Species list and ecological aspects. *Brazilian Journal of Biology*, 62(2), 285–291. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842002000200013>
- Rödger, D., Solé, M., & Böhme, W. (2008). Predicting the potential distributions of two alien invasive Housegeckos (Gekkonidae: *Hemidactylus frenatus*, *Hemidactylus mabouia*). *North-Western Journal of Zoology*, 4(2), 236–246.
- RStudio Team. (2021). *RStudio: Integrated Development Environment for R*. <http://www.rstudio.com/>
- Schrey, A. W., Alvarez, M., Foust, C. M., Kilvitis, H. J., Lee, J. D., Liebl, A. L., Martin,

- L. B., Richards, C. L., & Robertson, M. (2013). Ecological epigenetics: Beyond MS-AFLP. *Integrative and Comparative Biology*, 53(2), 340–350. <https://doi.org/10.1093/icb/ict012>
- Schrey, A. W., Coon, C. A. C., Grispo, M. T., Awad, M., Imboma, T., McCoy, E. D., Mushinsky, H. R., Richards, C. L., & Martin, L. B. (2012). Epigenetic Variation May Compensate for Decreased Genetic Variation with Introductions: A Case Study Using House Sparrows (*Passer domesticus*) on Two Continents. *Genetics Research International*, 2012, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2012/979751>
- Schrey, A. W., Robbins, T. R., Lee, J., Dukes, D. W., Ragsdale, A. K., Thawley, C. J., & Langkilde, T. (2016). Epigenetic response to environmental change: DNA methylation varies with invasion status. *Environmental Epigenetics*, 2(2), dvw008. <https://doi.org/10.1093/eep/dvw008>
- Schulz, B., Eckstein, R. L., & Durka, W. (2013). Scoring and analysis of methylation-sensitive amplification polymorphisms for epigenetic population studies. *Molecular Ecology Resources*, 13(4), 642–653. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12100>
- Sheldon, E. L., Schrey, A., Andrew, S. C., Ragsdale, A., & Griffith, S. C. (2018). Epigenetic and genetic variation among three separate introductions of the house sparrow (*Passer domesticus*) into Australia. *Royal Society Open Science*, 5(4). <https://doi.org/10.1098/rsos.172185>
- Short, Kristen H., & Petren, K. (2011). Multimodal dispersal during the range expansion of the tropical house gecko *Hemidactylus mabouia*. *Ecology and Evolution*, 1(2), 181–190. <https://doi.org/10.1002/ece3.18>
- Short, Kristen Harfmann, & Petren, K. (2011). Fine-scale genetic structure arises during range expansion of an invasive gecko. *PLoS ONE*, 6(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026258>
- Short, Kristen Harfmann, & Petren, K. (2012). Rapid species displacement during the invasion of Florida by the tropical house gecko *Hemidactylus mabouia*. *Biological Invasions*, 14(6), 1177–1186. <https://doi.org/10.1007/s10530-011-0147-z>
- Skvortsova, K., Iovino, N., & Bogdanović, O. (2018). Functions and mechanisms of epigenetic inheritance in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(12), 774–790. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0074-2>
- Sousa, J. G. G., Teixeira, A. A. M., Teles, D. A., Araújo-Filho, J. A., & Ávila, R. W. (2017). Feeding ecology of two sympatric geckos in an urban area of Northeastern Brazil. *Acta Herpetologica*, 12(1), 49–54. https://doi.org/10.13128/Acta_Herpetol-18354
- Telles, F. B. S., Militão, C. M., Bergallo, H. G., & Rocha, C. F. D. (2015). Invasion of the alien gecko *Hemidactylus mabouia* (Moureaux de Jonnès, 1818) in a natural

- habitat at Praia do Sul Biological Reserve, Ilha Grande, RJ, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 75(3), 768–770. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.19614>
- Tweedie, S., Charlton, J., Clark, V., & Bird, A. (1997). Methylation of genomes and genes at the invertebrate-vertebrate boundary. *Molecular and Cellular Biology*, 17(3), 1469–1475. <https://doi.org/10.1128/mcb.17.3.1469>
- Van Gorp, T. P., Wagemaker, N. C. A. M., Wouters, B., Vergeer, P., Ouborg, J. N. J., & Verhoeven, K. J. F. (2016). EpiGBS: Reference-free reduced representation bisulfite sequencing. *Nature Methods*, 13(4), 322–324. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3763>
- Vanyushin, B. F., Mazin, A. L., Vasilyev, V. K., & Belozersky, A. N. (1973). The content of 5-methylcytosine in animal DNA: The species and tissue specificity. *BBA Section Nucleic Acids And Protein Synthesis*, 299(3), 397–403. [https://doi.org/10.1016/0005-2787\(73\)90264-5](https://doi.org/10.1016/0005-2787(73)90264-5)
- Vanyushin, B. F., Tkacheva, S. G., & Belozersky, A. N. (1970). Rare Bases in Animal DNA. *Nature*, 225, 948–949.
- Vanzolini, P. E. (1968). Lagartos brasileiros da família Gekkonidae (Sauria). *Arquivos de Zoologia*, 17(1), 1–84. <https://doi.org/10.11606/issn.2176-7793.v17i1p1-84>
- Vanzolini, P. E., Ramos-Costa, A. M. M., & Vitt, L. J. (1980). *Répteis das caatingas*. Academia Brasileira de Ciências. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.109659>
- Varriale, A. (2014). DNA Methylation, Epigenetics, and Evolution in Vertebrates: Facts and Challenges. *International Journal of Evolutionary Biology*, 2014, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2014/475981>
- Varriale, A., & Bernardi, G. (2006). DNA methylation in reptiles. *Gene*, 385, 122–127. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2006.05.034>
- Verhoeven, K. J. F., VonHoldt, B. M., & Sork, V. L. (2016). Epigenetics in ecology and evolution: What we know and what we need to know. *Molecular Ecology*, 25(8), 1631–1638. <https://doi.org/10.1111/mec.13617>
- Wenzel, M. A., & Piertney, S. B. (2014). Fine-scale population epigenetic structure in relation to gastrointestinal parasite load in red grouse (*Lagopus lagopus scotica*). *Molecular Ecology*, 23(17), 4256–4273. <https://doi.org/10.1111/mec.12833>
- Weterings, R., & Vetter, K. C. (2018). Invasive house geckos (*hemidactylus* spp.): Their current, potential and future distribution. *Current Zoology*, 64(5), 559–573. <https://doi.org/10.1093/cz/zox052>
- Williams, R., Pernetta, A. P., & Horrocks, J. A. (2016). Outcompeted by an invader? Interference and exploitative competition between tropical house gecko

- (*Hemidactylus mabouia*) and Barbados leaf-toed gecko (*Phyllodactylus pulcher*) for diurnal refuges in anthropogenic coastal habitats. *Integrative Zoology*, 11(3), 229–238. <https://doi.org/10.1111/1749-4877.12194>
- Winck, G. R., Almeida-Santos, M., Dorigo, T. A., Telles, F. B., & Rocha, C. F. D. (2017). When invasion may not be harmful: niche relations in a lizard assemblage. *Biotropica*, 49(1), 117–129. <https://doi.org/10.1111/btp.12348>
- Wogan, G. O. U., Yuan, M. L., Mahler, D. L., & Wang, I. J. (2020). Genome-wide epigenetic isolation by environment in a widespread *Anolis* lizard. *Molecular Ecology*, 29(1), 40–55. <https://doi.org/10.1111/mec.15301>
- Yang, C., Zhang, Y., Liu, W., Lu, X., & Li, C. (2018). Genome-wide analysis of DNA methylation in five tissues of sika deer (*Cervus nippon*). *Gene*, 645(December 2017), 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.12.032>
- Zemach, A., McDaniel, I. E., Silva, P., & Zilberman, D. (2010). Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation. *Science*, 328(5980), 916–919. <https://doi.org/10.1126/science.1186366>
- Zhou, J., Sears, R. L., Xing, X., Zhang, B., Li, D., Rockweiler, N. B., Jang, H. S., Choudhary, M. N. K., Lee, H. J., Lowdon, R. F., Arand, J., Tabers, B., Gu, C. C., Cicero, T. J., & Wang, T. (2017). Tissue-specific DNA methylation is conserved across human, mouse, and rat, and driven by primary sequence conservation. *BMC Genomics*, 18(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4115-6>

TABELAS

Tabela 1: Diferentes tipos de resultado de acordo com a sensibilidade das enzimas. (+) e (-) representam a presença e ausência de fragmentos, respectivamente (Schulz et al., 2013).

	HPA	MSP	Metilação
Tipo I	+	+	Não metilado
Tipo II	-	+	Metilação ou hemi-metilação das citosinas internas
Tipo III	+	-	Hemi-metilação da citosina externa
Tipo IV	-	-	Hipermetilação ou mutação

Tabela 2: Lista dos adaptadores e primers utilizados (Schulz et al., 2013).

Primers	Sequência (5'-3')
<i>Adaptadores</i>	
HPA/MSP	GATCATGAGTCCTGCT
HPA/MSP	CGAGCAGGACTCATGA
EcoRI	CTCGTAGACTGCGTACC
EcoRI	AATTGGTACGCAGTCAC
<i>Pré-seletivos</i>	
EcoRI+A	GACTGCGTACCAATTCA
HPA/MSP	ATCATGAGTCCTGCTCGG
<i>Seletivos</i>	
HPA/MSP+TCCA	ATCATGAGTCCTGCTCGGTCCA
EcoRI+AAC (FAM)	GACTGCGTACCAATTCAAC
EcoRI+ACA (HEX)	GACTGCGTACCAATTCACA
EcoRI+AAG (NED)	GACTGCGTACCAATTCAAG

Tabela 3: Nível de polimorfismo (P%), índice de diversidade de Shannon (I) e de haplótipo (h), e loci exclusivos (Excl.).

	Geral			m-subepiloci			u- subepiloci			Excl.	
	P%	I	h	P%	I	h	P%	I	h		
<i>Brasília</i>											
CER	80,84	0,59	0,272	94,01	0,74	0,346	66,53	0,43	0,190	11	
FIG	82,96	0,62	0,287	92,61	0,72	0,340	72,48	0,50	0,229	28	
MUS	90,58	0,69	0,319	97,20	0,77	0,362	83,4	0,60	0,274	45	
<i>Salvador</i>											
CER	71,75	0,50	0,226	88,41	0,64	0,293	53,67	0,34	0,155	3	
FIG	51,06	0,34	0,155	65,48	0,45	0,206	35,41	0,22	0,099	12	
MUS	75,99	0,52	0,235	91,08	0,66	0,306	59,61	0,36	0,157	9	

Tabela 4: Análise de Variância Molecular (AMOVA) entre os três tecidos para cada uma das populações. Valores com “*” representam $p < 0,05$.

	Geral		m-subepiloci		u-subepiloci	
	Var	Φ_{PT}	Var	Φ_{PT}	Var	Φ_{PT}
<i>Brasília</i>						
Entre tecidos	6,71%	0,067*	5,98%	0,060*	7,88%	0,079*
Dentre tecidos	93,29%		94,02%		92,12%	
<i>Salvador</i>						
Entre tecidos	10,47%	0,105*	9,30%	0,093*	12,83	0,128*
Dentre tecidos	89,53%		90,70%		87,17	

Tabela 5: Análise de Variância Molecular (AMOVA) entre as duas populações para cada um dos tecidos. Valores com “*” representam $p < 0,05$.

	Geral		m-subepiloci		u- subepiloci	
	Var	Φ_{PT}	Var	Φ_{PT}	Var	Φ_{PT}
<i>Cérebro</i>						
Entre populações	14,95%	0,150*	12,19%	0,122*	20,02%	0,200*
Dentre populações	85,05%		87,81%		79,98%	
<i>Fígado</i>						
Entre populações	25,77%	0,258*	20,92%	0,209*	33,19%	0,332*
Dentre populações	74,23%		79,08%		66,81%	
<i>Músculo</i>						
Entre populações	11,73%	0,117*	9,23%	0,092*	15,63%	0,156*
Dentre populações	88,27%		90,77%		84,37%	

Tabela 6: Valores de r do teste de Mantel para a correlação entre a distância genética e epigenética. Valores com “*” representam $p < 0,05$.

	Todos			BSB			SSA		
	Geral	m-subepiloci	u-subepiloci	Geral	m-subepiloci	u-subepiloci	Geral	m-subepiloci	u-subepiloci
CER	0,222*	0,216*	0,196*	0,050	0,165	-0,055	-0,255*	-0,270*	-0,189*
FIG	0,406*	0,408*	0,334*	0,007	-0,016	0,038	0,306*	0,460*	0,064
MUS	0,238*	0,236*	0,215*	0,141	0,037	0,100	0,218	0,294*	0,259

FIGURAS

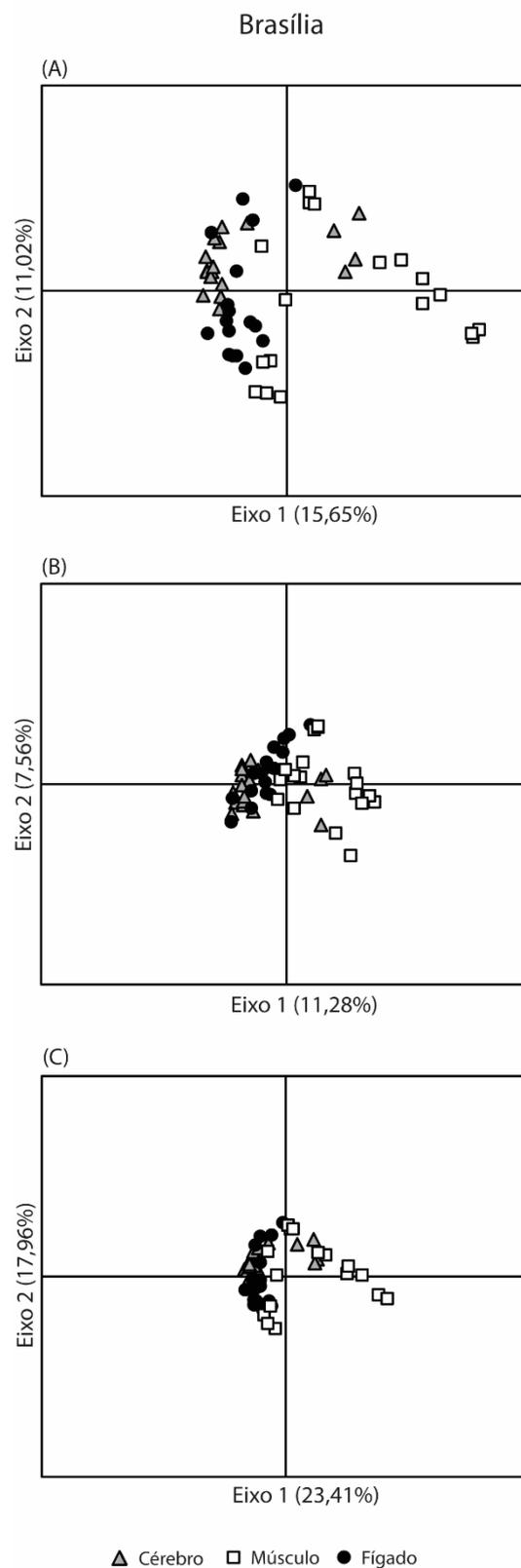


Figura 1: Análise dos Componentes Principais entre os três tecidos para os indivíduos de Brasília de acordo com (a) todos os conjuntos de marcadores, (b) m-subepiloci e (c) u-subepiloci.

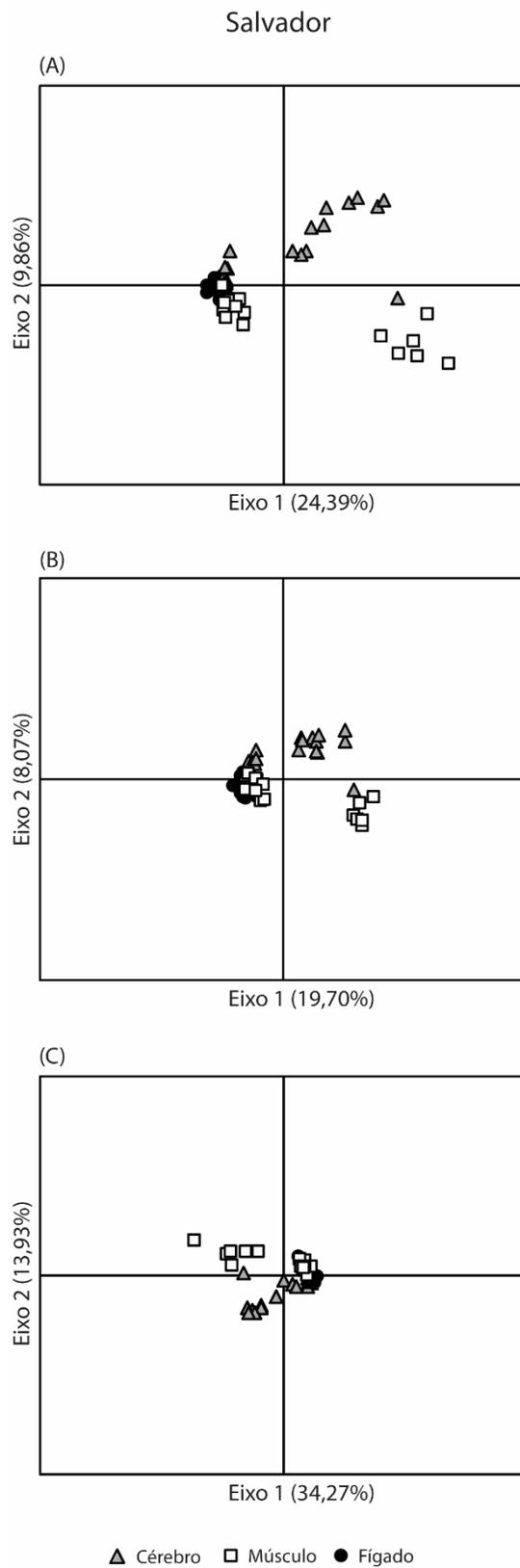


Figura 2: Análise dos Componentes Principais entre os três tecidos para os indivíduos de Salvador de acordo com (a) todos os conjuntos de marcadores, (b) m-subepiloci e (c) u-subepiloci.

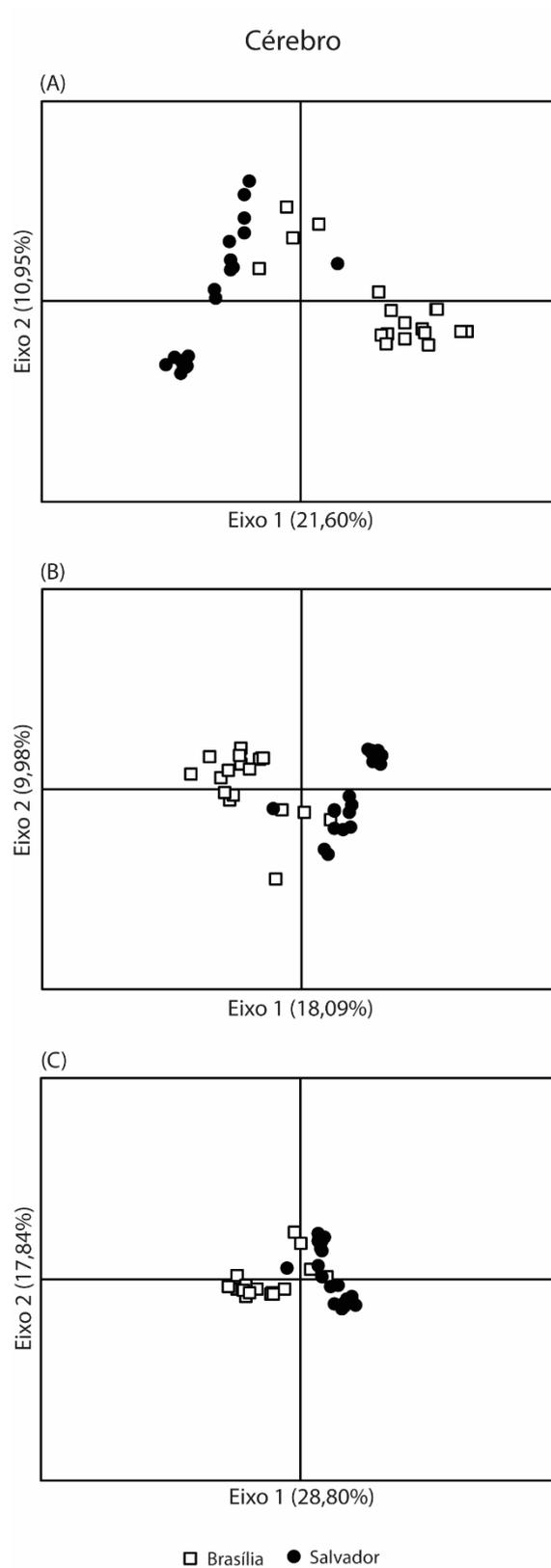


Figura 3: Análise dos Componentes Principais entre as populações de Brasília e Salvador utilizando o cérebro de acordo com (a) todos os conjuntos de marcadores, (b) m-subpiloci e (c) u-subpiloci.

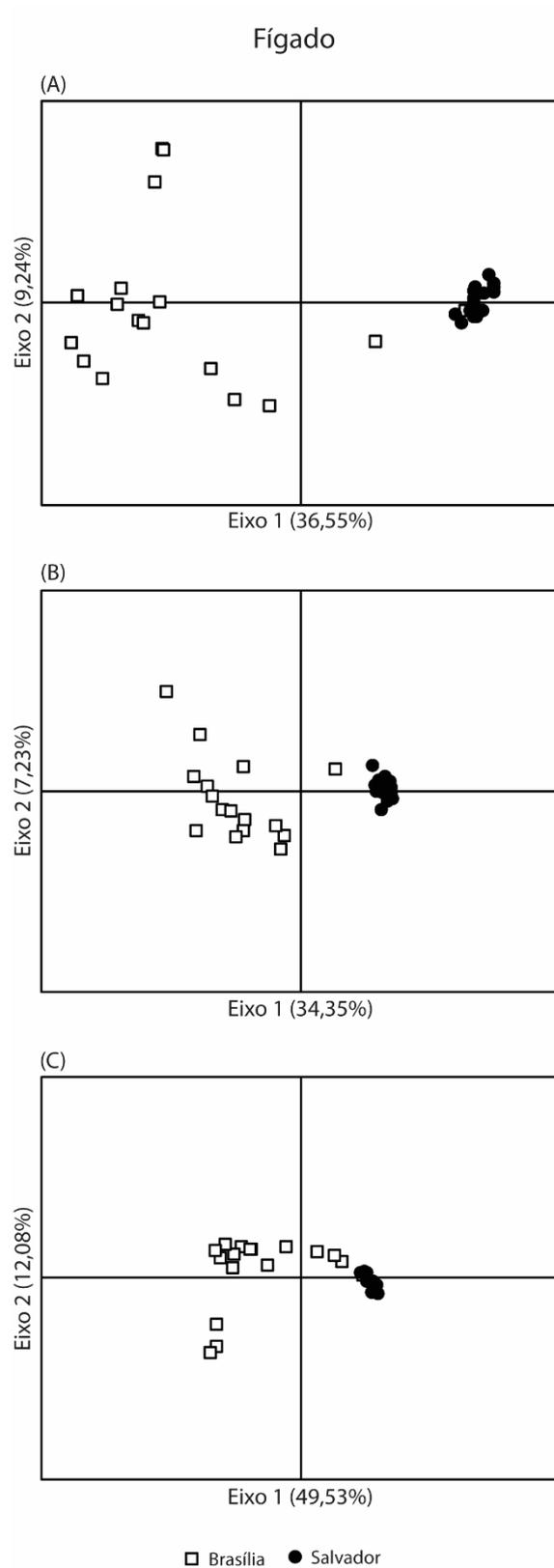


Figura 4: Análise dos Componentes Principais entre as populações de Brasília e Salvador utilizando o fígado de acordo com (a) todos os conjuntos de marcadores, (b) m-subepiloci e (c) u-subepiloci.

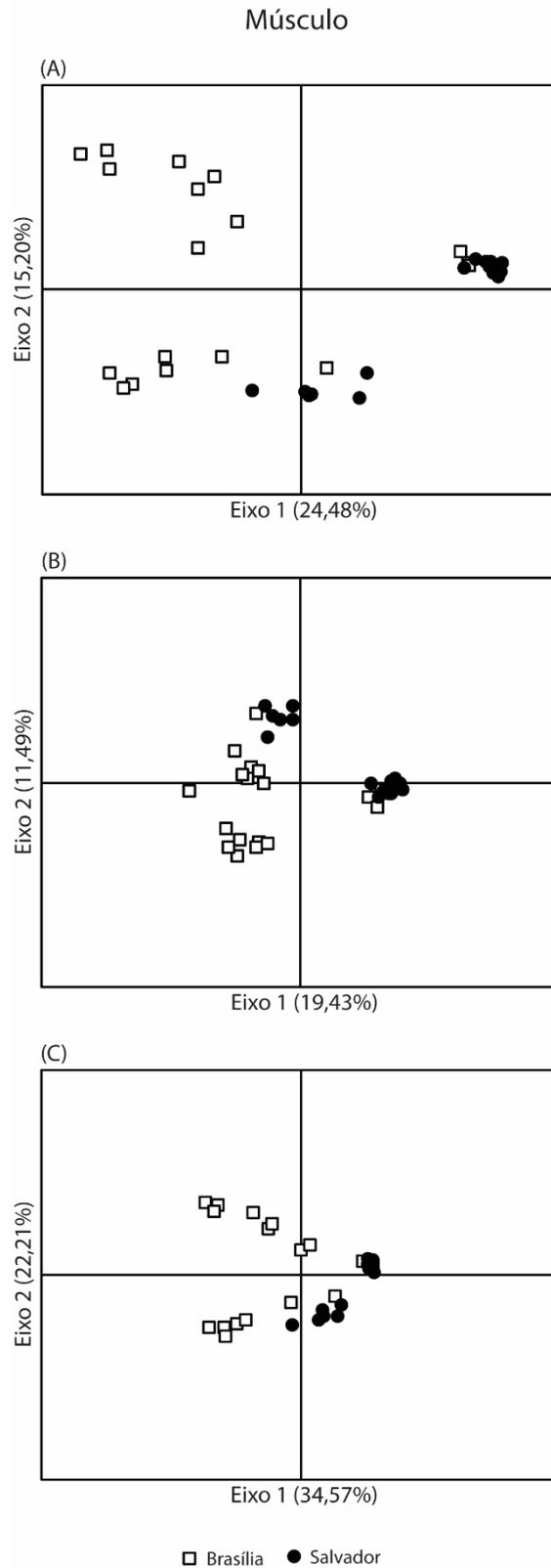


Figura 5: Análise dos Componentes Principais entre as populações de Brasília e Salvador utilizando o músculo de acordo com (a) todos os conjuntos de marcadores, (b) m-subepiloci e (c) u-subepiloci.