

Projeto: A fronteira da adaptação: padrões de expressão diferencial dos lagartos neotropicais nos ecótonos do Cerrado

Responsável técnico: Mário Júnior Nadaline (Pesquisador de Doutorado em Zoologia UFPR)

Orientador: Dr. Fabricius Maia Chaves Bicalho Domingos (Professor adjunto da UFPR)

Co-orientadora: Dra. Fernanda de Pinho Werneck (Pesquisadora Titular do INPA)

Introdução:

A busca pela compreensão da adaptação em nível molecular ao longo de gradientes ambientais é uma das investigações mais fascinantes da evolução (Todd et al., 2016). No entanto, essa busca tornou-se ainda mais crucial nos dias de hoje, à medida que testemunhamos modificações ambientais ocorrendo em ritmo acelerado, ultrapassando as mudanças naturais decorrentes de processos geológicos e climáticos. Nesse contexto, compreender os mecanismos moleculares subjacentes à adaptação é essencial para prever o potencial adaptativo das espécies e desenvolver estratégias sofisticadas de conservação (Fraik et al., 2019). Para atingir esse objetivo, é necessário ir além da avaliação isolada de variáveis em condições experimentais e investigar diretamente as respostas no ambiente natural (Pavey et al., 2012). Neste sentido, com informações acerca dos padrões de expressão gênica em gradientes ambientais pode fornecer importantes evidências de como a variabilidade fenotípica se manifesta em populações naturais (Ho et al., 2020; Bugg et al., 2023), bem como dos principais estressores ambientais que provocam tais as variações (Li & Ritchie, 2021). Enquanto o estudo do transcriptoma em condições experimentais tende a se concentrar em poucas variáveis controladas, a resposta em ambientes naturais revela-se complexa e multivariada, influenciada pela interação de diversas variáveis de naturezas distintas (disponibilidade de nutrientes, temperatura, precipitação, radiação e etc.) e até mesmo por fatores emergentes como os poluentes (Connon et al., 2018).

Os gradientes entre os biomas da Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica apresentam um vasto espectro de variações climáticas, bióticas e edáficas que possivelmente afetam a disponibilidade de recursos (Scalon et al., 2021; Muniz et al., 2022). Para os vertebrados que residem nessas regiões, uma série de desafios podem ser impostos, desde uma alta amplitude térmica diária em áreas savânicas, até pressões seletivas específicas de cada habitat adjacente. A variação imposta por ambientes florestais e abertos podem afetar diretamente o metabolismo energético e padrões de resposta ao dano UV (radiação ultravioleta; Yang et al., 2015). Desta forma, os lagartos são excelentes modelos ecológico-evolutivos para entender o impacto da variação ambiental dos ecótonos sob a fauna neotropical. Esses animais apresentam uma grande diversidade ecológica, morfológica e comportamental, ocorrendo desde afloramentos rochosos até ocos de árvores (Skeels et al., 2020). Além disso, eles dependem da temperatura ambiental para regular sua temperatura interna, o que facilita capturar efeitos do ambiente sobre o organismos, especialmente em ambientes com climas distintos como os biomas savânicos e florestais. Em especial, para *Tropidurus*, acumulamos conhecimentos sobre suas biologias térmicas, como seleção de micro-habitats, bem como as variáveis ambientais que melhor explicam sua distribuição (Ortega et al., 2019; Caetano et al., 2020). Esses fatores nos permitem avaliar e determinar que o tempo de atividade dos animais é um dos fatores que melhor prediz sua distribuição e também importância do conhecimento fisiológico na elaboração de modelos de distribuição (Caetano et al., 2020). Similarmente, esse arcabouço sobre a ecofisiologia dos animais nos permite inferir melhores previsões dos padrões de variabilidade fenotípica nas análises de transcriptomas. Por fim, nos últimos anos, houve a descrição de genomas para diversas espécies de lagartos, os quais, apesar de em sua grande maioria

serem genomas parciais e de linhagens distantes, podem ser úteis na identificação de genes envolvidos na adaptação às condições ambientais.

Dentre as diversas espécies de lagartos que habitam o Cerrado e seus ecótonos, *Tropidurus itambere* Rodrigues, 1987 (Squamata: Tropiduridae) é uma das espécies com maior detectabilidade. Essa detectabilidade é resultado de sua grande densidade populacional em algumas regiões (Van Sluys, 2000) e por seu hábito saxícola facilitar que estes animais sejam observados sobre pedras em ambientes naturais. Dentre as poucas filogenias que incorporam *T. itambere*, ambas suportam a espécie como pertencente ao grupo de espécies *T. torquatus* (Frost et al., 2001; Carvalho et al., 2016). Dentre as espécies deste grupo, *T. itambere* se distingue pela presença de bolsas de ácaros nas regiões inguinal e na lateral do pescoço, apesar que a profundidade das bolsas apresenta variação individual (Rodrigues, 1987). Todavia, recentemente, com o uso de métodos coalescentes de delimitação de espécies, foi demonstrado uma diversidade críptica para *T. itambere* com cinco grupos distintos estrutural e geograficamente (Domingos et al., 2017). Contudo, apesar de conhecermos o padrão de diversidade críptica, ainda não foram investigados os processos evolutivos por trás dessa estruturação. Desta maneira, análises transcriptômicas da espécie podem também contribuir para a identificação de possíveis processos adaptativos. Dentro desta perspectiva, uma hipótese para explicar a diferenciação entre populações habitando locais diferentes são mudanças na capacidade dos organismos em se reconhecerem via sistema sensorial (Loire et al., 2017). Desta forma, além de desconhecermos os fatores que levaram à diferenciação das populações (ou grupos de espécies), o compreender como pressões seletivas distintas podem ter atuado ao longo do Cerrado e ecótonos podem fornecer importantes evidências da trajetória evolutiva e demográfica de organismos em zonas ecotonais, e do papel dos ecótonos na geração e manutenção da biodiversidade.

Nesse capítulo pretendemos identificar padrões regionais e os processos biogeográficos e ecológicos determinantes da variação espacial do processo adaptativo da biota neotropical, usando lagartos como organismos modelo. Com isso, esperamos elucidar alguns dos processos responsáveis pelos padrões adaptativos e pela variação fenotípica nos três maiores biomas brasileiros, bem como nas regiões de transição entre eles. Para isso, amostraremos comparativamente distintas populações de *T. itambere* coletadas desde o limite sul do Cerrado, ecótono com a Mata Atlântica, até a região ecotonal do Cerrado e Amazônia (zona oeste do Cerrado), perfazendo também algumas populações no interior do bioma. Nosso objetivo é avaliar as estratégias evolutivas das populações centrais e ecotonais, buscando responder a seguinte pergunta: existem convergências evolutivas entre as populações de ambos os ecótonos? Nossa hipótese é que as populações mais influenciadas pelos biomas florestais apresentarão convergências de transcritos. Além disso, vamos avaliar a variabilidade genética e de transcritos entre as populações centrais e ecotonais, buscando responder se existem diferenças na variabilidade de transcritos entre as populações centrais e periféricas. Neste caso, testaremos a hipótese de que as populações centrais, que experimentaram relativa estabilidade climática durante o Quaternário, apresentarão uma maior variabilidade de transcritos sob seleção e maior variabilidade genética. Adicionalmente, iremos comparar a distribuição dos grupos de genes funcionais em relação aos ambientes heterogêneos e homogêneos, como o Cerrado central. Para isso, responderemos à pergunta: "Regiões homogêneas apresentam um menor número de grupos de genes funcionais?" Testaremos a hipótese de que em paisagens mais homogêneas, a pressão seletiva tende a ser mais conservativa. Por fim, analisaremos se existem processos adaptativos responsáveis pela diferenciação das populações de *T. itambere*. Para isso, responderemos à pergunta: existem divergências no sistema sensorial entre as

populações? Testaremos a hipótese de que as mudanças ambientais ao longo do gradiente afetam a comunicação química dos indivíduos, levando a uma variação no transcriptoma da região vômero nasal de *T. itambere*.

Material e Métodos

*Amostragem de populações de *Tropiduros itambere**

Para amostrar diferentes porções do gradiente ecotonal do Cerrado-Mata Atlântica e Cerrado-Amazônia coletaremos 6 populações de *T. itambere*, das quais duas serão coletadas na região de ecótono do Cerrado-Mata Atlântica, outras duas no Cerrado central e por fim 2 populações na região de ecótono Cerrado-Amazônia. As áreas de Cerrado-Mata Atlântica serão o Parque Estadual do Cerrado (Jaguaraíva, Paraná) no limite sul do Cerrado e o Parque Nacional do Itatiaia (Bocaina de Minas, Minas Gerais), já as regiões centrais serão no Distrito Federal (Brasília) e Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros (Alto Paraiso, Goiás). As localidades de ecótono Cerrado-Amazônia serão em Nova Xavantina (Mato Grosso) e Nova Monte Verde (Mato Grosso) no limite norte de distribuição de *T. itambere* (Ávila & Kawashita-Ribeiro, 2011).

Para garantir uma amostragem representativa da população em cada localidade, planejamos coletar pelo menos cinco animais em cada área. A busca ativa com o uso de laços será o método principal de coleta, principalmente nas primeiras horas do dia, quando os animais ainda estão em processo de termorregulação. Essa abordagem visa maximizar a eficiência da captura dos lagartos. Durante a coleta de cada animal, registraremos os seguintes dados: temperatura cloacal, temperatura e umidade do solo e do ar no local de coleta, comprimento rostro-cloacal (CRC), peso e sexo. Essas informações são especialmente importantes para controlar possíveis efeitos confundidores durante as análises estatísticas de expressão genética. Essa abordagem será conduzida conforme as recomendações de boas práticas para análises de transcriptoma da paisagem (Keagy et al., 2023). Além disso, concentraremos as coletas no mesmo período do dia, o que ajudará a reduzir os efeitos do ciclo circadiano sobre a expressão genética. Estudos anteriores demonstraram que o ciclo circadiano pode influenciar a expressão genética em outros organismos (Covington et al., 2008).

Coleta e Análise de dados transcriptômicos

Os animais coletados serão eutanasiados imediatamente em campo para preservar o perfil transcriptômico do ambiente natural. Para isso utilizaremos xilocaína 10mg/Kg e, em seguida serão coletados o fígado, músculo caudal, cérebro e região vômero nasal. A amostra de tecido será transferida para 1ml de RNAlater™ (®ThermoFisher) que desempenha a função de estabilizante de RNA, seguindo as especificações do fabricante. Em seguida o RNA será extraído usando o kit RNA RNeasy (®Qiagen) e será quantificado usando fluorômetro Qubit 4.0 fluorometer (®Life technologies, Inc). Para verificar a qualidade e tamanhos de fragmentos de RNA utilizaremos o Bioanalisador 2100 (®Agilent Technologies).

Para o preparo das bibliotecas de sequenciamento utilizaremos kit ®Illumina TruSeq RNA v2 o qual em suas etapas converte o RNA em cDNA e ao final liga os adaptadores Illumina nos fragmentos. As bibliotecas serão quantificadas usando o kit Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay (®Life Technologies) e em seguida a média de tamanho de fragmentos será mensurada usando o LabChip GX (PerkinElmer). Após isso normalizaremos as bibliotecas em 2nM e, após desnaturar e diluir para 9 pM, iremos conduzir o agrupamento com o cBot então sequenciado na plataforma Illumina HiSeq 2000 com 100 pb paired-end.

As sequências geradas serão demultiplexadas e análise de qualidade de bases usando o algoritmo bcl2fastq v.1.8.4 (©Illumina) e convertidas em fastq. Em seguida removeremos os adaptadores e contaminantes. Após, anotaremos as sequências usando Trinotate (Hass et al., 2013) e utilizaremos o algoritmo BWA (Li & Durbin, 2009) para alinhamento de novo. Faremos a contagem bruta de leituras usando o RSEM (Li & Dewey, 2011) que no sentido biológico é a intensidade de expressão de cada gene. Utilizaremos o pacote do R adegnet (Jombart & Ahmed, 2011) para coletar métricas de variabilidade genética, como heterozigosidade esperada, diversidade nucleotídica e proporção de loci polimórficos, as quais serão comparadas com a diversidade de transcritos entre as populações utilizando AMOVA (Analysis of molecular variance).

A análise de expressão diferencial será realizada a partir dos pacotes EdgeR (Robinson et al., 2010) e Deseq2 (Love et al., 2014) disponíveis na plataforma R (R CRAN, 2010). Isso será importante por duas razões: primeiro por permitir uma validação cruzada e, segundo, por ambas as abordagens apresentaram diferenças na sensibilidade de genes diferencialmente expressos, aumentando assim nossa capacidade de encontrar genes relevantes. Enquanto o EdgeR usa distribuição binomial negativa para lidar com a variabilidade de dados de RNA-seq, o Deseq2 usa uma distribuição generalizada binomial negativa (GLM) o que, na prática, faz com que EdgeR tenha maior desempenho em detectar genes com baixos níveis de expressão enquanto Deseq2 acomoda melhor o tamanho do fenômeno e o desequilíbrio entre condições ambientais.

Para entender o impacto das variáveis climáticas e vegetacionais na expressão de genes, utilizaremos inicialmente correlações simples entre os níveis de expressão com as variáveis bioclimáticas do WorldClim 2 (Fick & Hijmans, 2017) e índice de cobertura vegetal usando modelos dinâmicos globais de dinâmica da vegetação (Sitch et al., 2008). Utilizaremos as seguintes variáveis bioclimáticas: temperatura média anual (BIO01), temperatura máxima do mês mais quente (BIO05), temperatura mínima do mês mais frio (BIO06), sazonalidade de temperatura (BIO04), precipitação anual (BIO12), precipitação do mês mais frio (BIO13), precipitação do mês mais seco (BIO14) e sazonalidade de precipitação (BIO15). Após as correlações, quantificaremos o impacto particionado de cada variável sobre a expressão de genes específicos usando modelos de regressão linear generalizada (GLM). Em seguida utilizaremos o BLAST (Altschul, 1997) para identificar os principais genes transcritos e também as vias metabólicas associadas usando o banco de dados KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). A partir disso, será possível implementar uma abordagem de enriquecimento de vias no qual identificaremos vias metabólicas enriquecidas que sejam relacionadas a condições climáticas ou vegetacionais. Por fim, investigaremos os impactos das nossas variáveis preditoras nas redes de coexpressão dos genes, que permitirá sabermos se a rede de interação é afetada ou sofre modificações ao longo do gradiente ecotonal. Para isso construiremos modelos WGCNA (Weighted Gene Co-expression Network Analysis) com o pacote do R WGCNA (Langfelder & Horvath, 2008).

Referências

- Altschul, S. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389–3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Angilletta, M. J. (2006). Estimating and comparing thermal performance curves. *Journal of Thermal Biology*, 31(7), 541–545. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2006.06.002>
- Ávila, R. W., & Kawashita-Ribeiro, R. A. (2011). Herpetofauna of são João da barra hydroelectric plant, state of mato grosso, brazil. *Check List*, 7(6), 750–755. <https://doi.org/10.15560/11014>

- Bellard, C., Bertelsmeier, C., Leadley, P., Thuiller, W., & Courchamp, F. (2012). Impacts of climate change on the future of biodiversity: Biodiversity and climate change. *Ecology Letters*, 15(4), 365–377. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2011.01736.x>
- Bishop, A. P., Westeen, E. P., Yuan, M. L., Escalona, M., Beraut, E., Fairbairn, C., Marimuthu, M. P. A., Nguyen, O., Chumchim, N., Toffelmier, E., Fisher, R. N., Shaffer, H. B., & Wang, I. J. (2023). Assembly of the largest squamate reference genome to date: The western fence lizard, *Sceloporus occidentalis*. *Journal of Heredity*, esad037. <https://doi.org/10.1093/jhered/esad037>
- Bridle, J. R., Kawata, M., & Butlin, R. K. (2019). Local adaptation stops where ecological gradients steepen or are interrupted. *Evolutionary Applications*, 12(7), 1449–1462. <https://doi.org/10.1111/eva.12789>
- Bridle, J. R., & Vines, T. H. (2007). Limits to evolution at range margins: When and why does adaptation fail? *Trends in Ecology & Evolution*, 22(3), 140–147. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.11.002>
- Brown, J. L., Hill, D. J., Dolan, A. M., Carnaval, A. C., & Haywood, A. M. (2018). PaleoClim, high spatial resolution paleoclimate surfaces for global land areas. *Scientific Data*, 5(1), 180254. <https://doi.org/10.1038/sdata.2018.254>
- Bugg, W. S., Thorstensen, M. J., Marshall, K. E., Anderson, W. G., & Jeffries, K. M. (2023). Elevated temperatures reduce population-specific transcriptional plasticity in developing lake sturgeon (*acipenser fulvescens*). *Molecular Ecology*, mec.16967. <https://doi.org/10.1111/mec.16967>
- Caetano, G. H. O., Santos, J. C., Godinho, L. B., Cavalcante, V. H. G. L., Diele-Viegas, L. M., Campelo, P. H., Martins, L. F., Oliveira, A. F. S., Alvarenga, J. M., Wiederhecker, H. C., De Novaes E Silva, V., Werneck, F. P., Miles, D. B., Colli, G. R., & Sinervo, B. R. (2020). Time of activity is a better predictor of the distribution of a tropical lizard than pure environmental temperatures. *Oikos*, 129(7), 953–963. <https://doi.org/10.1111/oik.07123>
- Capblancq, T., & Forester, B. R. (2021). Redundancy analysis: A swiss army knife for landscape genomics. *Methods in Ecology and Evolution*, 12(12), 2298–2309. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13722>
- Carnaval, A. C., Hickerson, M. J., Haddad, C. F. B., Rodrigues, M. T., & Moritz, C. (2009). Stability predicts genetic diversity in the brazilian atlantic forest hotspot. *Science*, 323(5915), 785–789. <https://doi.org/10.1126/science.1166955>
- Carvalho, A. L. G., Sena, M. A., Peloso, P. L. V., Machado, F. A., Montesinos, R., Silva, H. R., Campbell, G., & Rodrigues, M. T. (2016). A new tropidurus (Tropiduridae) from the semiarid brazilian caatinga: Evidence for conflicting signal between mitochondrial and nuclear loci affecting the phylogenetic reconstruction of south american collared lizards. *American Museum Novitates*, 3852(3852), 1–68. <https://doi.org/10.1206/3852.1>
- Caye, K., Jumentier, B., Lepeule, J., & François, O. (2019). Lfmm 2: Fast and accurate inference of gene-environment associations in genome-wide studies. *Molecular Biology and Evolution*, 36(4), 852–860. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz008>
- Climate change 2021 the physical science basis (1ST ED). ([s.d.]). CAMBRIDGE UNIV PRESS UK.
- Clusella-Trullas, S., & Chown, S. L. (2014). Lizard thermal trait variation at multiple scales: A review. *Journal of Comparative Physiology B*, 184(1), 5–21. <https://doi.org/10.1007/s00360-013-0776-x>
- Colli, G. R. (1991). Reproductive ecology of ameiva ameiva (Sauria, teiidae) in the cerrado of central brazil. *Copeia*, 1991(4), 1002. <https://doi.org/10.2307/1446095>
- Connon, R. E., Jeffries, K. M., Komoroske, L. M., Todgham, A. E., & Fangue, N. A. (2018). The utility of transcriptomics in fish conservation. *Journal of Experimental Biology*, 221(2), jeb148833. <https://doi.org/10.1242/jeb.148833>
- Costa, G. C., Hampe, A., Ledru, M., Martinez, P. A., Mazzochini, G. G., Shepard, D. B., Werneck, F. P., Moritz, C., Carnaval, A. C., & Fortin, M. (2018). Biome stability in South America over the last 30 kyr: Inferences from long-term vegetation dynamics and habitat modelling. *Global Ecology and Biogeography*, 27(3), 285–297. <https://doi.org/10.1111/geb.12694>
- Costa, T. R., da Silva, L. A., de Moura, C. C., de Souto Azevedo, C. H., Bueno, M. L., Mucida, D. P., Santos, T., & Gonzaga, A. P. D. (2023). Vulnerability of the cerrado-atlantic forest ecotone in the espinhaço range biosphere reserve to climate change. *Theoretical and Applied Climatology*, 151(3), 1151–1170. <https://doi.org/10.1007/s00704-022-04321-z>
- Covington, M. F., Maloof, J. N., Straume, M., Kay, S. A., & Harmer, S. L. (2008). Global transcriptome analysis reveals circadian regulation of key pathways in plant growth and development. *Genome Biology*, 9(8), R130. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-8-r130>
- Dauphin, B., Rellstab, C., Wüest, R. O., Karger, D. N., Holderegger, R., Gugerli, F., & Manel, S. (2023). Re-thinking the environment in landscape genomics. *Trends in Ecology & Evolution*, 38(3), 261–274. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2022.10.010>
- Deutsch, C. A., Tewksbury, J. J., Huey, R. B., Sheldon, K. S., Ghalambor, C. K., Haak, D. C., & Martin, P. R. (2008). Impacts of climate warming on terrestrial ectotherms across latitude. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(18), 6668–6672. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709472105>
- Diniz-Filho, J. A. F., De Oliveira Ferraz Barbosa, A. C., Chaves, L. J., Da Silva E Souza, K., Dobrovolski, R., Rattis, L., Terribile, L. C., Lima-Ribeiro, M. S., De Oliveira, G., Brum, F. T., Loyola, R., & De Campos Telles, M. P. (2020). Overcoming the worst of both worlds: Integrating climate change and habitat loss into spatial conservation planning of genetic diversity in the Brazilian Cerrado. *Biodiversity and Conservation*, 29(5), 1555–1570. <https://doi.org/10.1007/s10531-018-1667-y>
- Domingos, F. M. C. B., Colli, G. R., Lemmon, A., Lemmon, E. M., & Beheregaray, L. B. (2017). In the shadows: Phylogenomics and coalescent species delimitation unveil cryptic diversity in a Cerrado endemic lizard (Squamata: tropidurus). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 107, 455–465. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.12.009>
- Eaton, D. A. R. (2014). PyRAD: Assembly of de novo RADseq loci for phylogenetic analyses. *Bioinformatics*, 30(13), 1844–1849. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu121>

- Eckert, C. G., Samis, K. E., & Loughheed, S. C. (2008). Genetic variation across species' geographical ranges: The central–marginal hypothesis and beyond. *Molecular Ecology*, 17(5), 1170–1188. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03659.x>
- Elias, F., Marimon, B. S., Reis, S. M. A., Forsthofer, M., Gomes, L., Morandi, P. S., & Marimon-Junior, B. H. (2013). Dinâmica da Distribuição Espacial de Populações Arbóreas, ao Longo de uma Década, em Cerradão na Transição Cerrado-Amazônia, Mato Grosso. *Biota Amazônia*, 3(3), 1–14. <https://doi.org/10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v3n3p1-14>
- Ellis, N., Smith, S. J., & Pitcher, C. R. (2012). Gradient forests: Calculating importance gradients on physical predictors. *Ecology*, 93(1), 156–168. <https://doi.org/10.1890/11-0252.1>
- Ferreira, L. V., Venticinqu, E., & Almeida, S. (2005). O desmatamento na Amazônia e a importância das áreas protegidas. *Estudos Avançados*, 19(53), 157–166. <https://doi.org/10.1590/S0103-40142005000100010>
- Ferrier, S., Manion, G., Elith, J., & Richardson, K. (2007). Using generalized dissimilarity modelling to analyse and predict patterns of beta diversity in regional biodiversity assessment. *Diversity and Distributions*, 13(3), 252–264. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4642.2007.00341.x>
- Fick, S. E., & Hijmans, R. J. (2017). WorldClim 2: New 1-km spatial resolution climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*, 37(12), 4302–4315. <https://doi.org/10.1002/joc.5086>
- Fraik, A. K., Quackenbush, C., Margres, M. J., Comte, S., Hamilton, D. G., Kozakiewicz, C. P., Jones, M., Hamed, R., Hohenlohe, P. A., Storf, A., & Kelley, J. L. (2019). Transcriptomics of tasmanian devil (*Sarcophilus harrisii*) ear tissue reveals homogeneous gene expression patterns across a heterogeneous landscape. *Genes*, 10(10), 801. <https://doi.org/10.3390/genes10100801>
- Françoso, R. D., Brandão, R., Nogueira, C. C., Salmons, Y. B., Machado, R. B., & Colli, G. R. (2015). Habitat loss and the effectiveness of protected areas in the Cerrado Biodiversity Hotspot. *Natureza & Conservação*, 13(1), 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.ncon.2015.04.001>
- Franssen, S. U., Gu, J., Bergmann, N., Winters, G., Klostermeier, U. C., Rosenstiel, P., Bornberg-Bauer, E., & Reusch, T. B. H. (2011). Transcriptomic resilience to global warming in the seagrass *Zostera marina*, a marine foundation species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(48), 19276–19281. <https://doi.org/10.1073/pnas.1107680108>
- Freedman, A. H., Harrigan, R. J., Zhen, Y., Hamilton, A. M., & Smith, T. B. (2023). Evidence for ecotone speciation across an African rainforest–savanna gradient. *Molecular Ecology*, 32(9), 2287–2300. <https://doi.org/10.1111/mec.16867>
- Frost, D. R., Rodrigues, M. T., Grant, T., & Titus, T. A. (2001). Phylogenetics of the lizard genus *Tropidurus* (Squamata: Tropiduridae: tropidurinae): direct optimization, descriptive efficiency, and sensitivity analysis of congruence between molecular data and morphology. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 21(3), 352–371. <https://doi.org/10.1006/mpev.2001.1015>
- Gainsbury, A. M., & Colli, G. R. (2003). Lizard assemblages from natural cerrado enclaves in southwestern amazonia: The role of stochastic extinctions and isolation. *Biotropica*, 35(4), 503–519. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2003.tb00607.x>
- Ghalambor, C. K. (2006). Are mountain passes higher in the tropics? Janzen's hypothesis revisited. *Integrative and Comparative Biology*, 46(1), 5–17. <https://doi.org/10.1093/icb/icj003>
- Gokmen Zararsiz, D. G. (2017). *MLseq*. Bioconductor. <https://doi.org/10.18129/B9.BIOC.MLSEQ>
- Gordon Smyth [Cre, A. (2017). *Limma*. Bioconductor. <https://doi.org/10.18129/B9.BIOC.LIMMA>
- Gunderson, A. R., & Stillman, J. H. (2015). Plasticity in thermal tolerance has limited potential to buffer ectotherms from global warming. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1808), 20150401. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.0401>
- Haas, B. J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P. D., Bowden, J., Couger, M. B., Eccles, D., Li, B., Lieber, M., MacManes, M. D., Ott, M., Orvis, J., Pochet, N., Strozzi, F., Weeks, N., Westerman, R., William, T., Dewey, C. N., ... Regev, A. (2013). De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols*, 8(8), 1494–1512. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.084>
- Hain, T., Ghai, R., Billion, A., Kuenne, C. T., Steinweg, C., Izar, B., Mohamed, W., Mraheil, M. A., Domann, E., Schaffrath, S., Käst, U., Goesmann, A., Oehm, S., Pühler, A., Merkl, R., Vorwerk, S., Glaser, P., Garrido, P., Rusniok, C., ... Chakraborty, T. (2012). Comparative genomics and transcriptomics of lineages I, II, and III strains of *Listeria monocytogenes*. *BMC Genomics*, 13(1), 144. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-144>
- Haldane, J. B. (1956) The relation between density regulation and natural selection. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B - Biological Sciences*, 145(920), 306–308. <https://doi.org/10.1098/rspb.1956.0039>
- Hall, K. R., Anantharaman, R., Landau, V. A., Clark, M., Dickson, B. G., Jones, A., Platt, J., Edelman, A., & Shah, V. B. (2021). Circuitscape in julia: Empowering dynamic approaches to connectivity assessment. *Land*, 10(3), 301. <https://doi.org/10.3390/land10030301>
- Ho, W.-C., Li, D., Zhu, Q., & Zhang, J. (2020). Phenotypic plasticity as a long-term memory easing readaptations to ancestral environments. *Science Advances*, 6(21), eaba3388. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aba3388>
- Hohenlohe, P. A., Bassham, S., Etter, P. D., Stiffler, N., Johnson, E. A., & Cresko, W. A. (2010). Population genomics of parallel adaptation in threespine stickleback using sequenced rad tags. *PLoS Genetics*, 6(2), e1000862. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000862>
- IPCC (2021) *Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, Masson-Delmotte, V., P. Zhai, A. Pirani, S.L. Connors, C. Péan, S. Berger, N. Caud, Y. Chen, L. Goldfarb, M.I. Gomis, M. Huang, K. Leitzell, E. Lonnoy, J.B.R. Matthews, T.K. Maycock, T. Waterfield, O. Yelekçi, R. Yu, and B. Zhou. Cambridge University Press. In Press.
- Jaramillo, C. (2023). The evolution of extant South American tropical biomes. *New Phytologist*, 239(2), 477–493. <https://doi.org/10.1111/nph.18931>

- Jombart, T., & Ahmed, I. (2011). adegenet 1. 3-1: New tools for the analysis of genome-wide snp data. *Bioinformatics*, 27(21), 3070–3071. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr521>
- Kark, S., & Van Rensburg, B. J. (2006). Ecotones: Marginal or central areas of transition? *Israel Journal of Ecology and Evolution*, 52(1), 29–53. <https://doi.org/10.1560/IJEE.52.1.29>
- Keagy, J., Drummond, C. P., Gilbert, K. J., Grozinger, C. M., Hamilton, J., Hines, H. M., Lasky, J., Logan, C. A., Sawers, R., & Wagner, T. (2023). Landscape transcriptomics as a tool for addressing global change effects across diverse species. *Molecular Ecology Resources*, 1755-0998.13796. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13796>
- Kratochwil, C. F., & Meyer, A. (2015). Closing the genotype-phenotype gap: Emerging technologies for evolutionary genetics in ecological model vertebrate systems: Prospects & Overviews. *BioEssays*, 37(2), 213–226. <https://doi.org/10.1002/bies.201400142>
- Langfelder, P., & Horvath, S. (2008). WGCNA: An R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics*, 9(1), 559. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-559>
- Li, B., & Dewey, C. N. (2011). RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*, 12(1), 323. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-323>
- Li, B., & Ritchie, M. D. (2021). From gwas to gene: Transcriptome-wide association studies and other methods to functionally understand gwas discoveries. *Frontiers in Genetics*, 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2021.713230>
- Li, H., & Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25(14), 1754–1760. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>
- Lloyd, K. M., McQueen, A. A. M., Lee, B. J., Wilson, R. C. B., Walker, S., & Wilson, J. B. (2000). Evidence on ecotone concepts from switch, environmental and anthropogenic ecotones. *Journal of Vegetation Science*, 11(6), 903–910. <https://doi.org/10.2307/3236560>
- Logan, M. L., & Cox, C. L. (2020). Genetic constraints, transcriptome plasticity, and the evolutionary response to climate change. *Frontiers in Genetics*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2020.538226>
- Loire, E., Tusso, S., Caminade, P., Severac, D., Boursot, P., Ganem, G., & Smadja, C. M. (2017). Do changes in gene expression contribute to sexual isolation and reinforcement in the house mouse? *Molecular Ecology*, 26(19), 5189–5202. <https://doi.org/10.1111/mec.14212>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Maksic, J., Venancio, I. M., Shimizu, M. H., Chiessi, C. M., Piacsek, P., Sampaio, G., Cruz, F. W., & Alexandre, F. F. (2022). Brazilian biomes distribution: Past and future. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 585, 110717. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2021.110717>
- Marques, E. Q., Marimon-Junior, B. H., Marimon, B. S., Matricardi, E. A. T., Mews, H. A., & Colli, G. R. (2020). Redefining the Cerrado–Amazonia transition: Implications for conservation. *Biodiversity and Conservation*, 29(5), 1501–1517. <https://doi.org/10.1007/s10531-019-01720-z>
- Mesquita, D. O., Colli, G. R., & Vitt, L. J. (2007). Ecological release in lizard assemblages of neotropical savannas. *Oecologia*, 153(1), 185–195. <https://doi.org/10.1007/s00442-007-0725-z>
- Morgan, K., Mboumba, J.-F., Ntie, S., Mickala, P., Miller, C. A., Zhen, Y., Harrigan, R. J., Le Underwood, V., Ruegg, K., Fokam, E. B., Tasse Taboue, G. C., Sesink Clee, P. R., Fuller, T., Smith, T. B., & Anthony, N. M. (2020). Precipitation and vegetation shape patterns of genomic and craniometric variation in the central African rodent *Praomys misonnei*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 287(1930), 20200449. <https://doi.org/10.1098/rspb.2020.0449>
- Muniz, A. C., Pimenta, R. J. G., Cruz, M. V., Rodrigues, J. G., Buzatti, R. S. D. O., Heuertz, M., Lemos-Filho, J. P., & Lovato, M. B. (2022). Hybrid zone of a tree in a Cerrado/Atlantic Forest ecotone as a hotspot of genetic diversity and conservation. *Ecology and Evolution*, 12(1). <https://doi.org/10.1002/ece3.8540>
- Murrish, D. E., & Vance, V. J. (1968). Physiological responses to temperature acclimation in the lizard *Uta mearnsi*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 27(1), 329–337. [https://doi.org/10.1016/0010-406X\(68\)90775-5](https://doi.org/10.1016/0010-406X(68)90775-5)
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Da Fonseca, G. A. B., & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(6772), 853–858. <https://doi.org/10.1038/35002501>
- Oliveira, P., & Marquis, R. (Orgs.). (2002). The cerrados of Brazil: Ecology and natural history of a neotropical savanna. Columbia University Press. <https://doi.org/10.7312/oliv12042>
- Oliveras, I., & Malhi, Y. (2016). Many shades of green: The dynamic tropical forest–savannah transition zones. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1703), 20150308. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0308>
- Ortega, Z., Mencía, A., Martins, K., Soares, P., Ferreira, V. L., & Oliveira-Santos, L. G. (2019). Disentangling the role of heat sources on microhabitat selection of two Neotropical lizard species. *Journal of Tropical Ecology*, 35(4), 149–156. <https://doi.org/10.1017/S0266467419000099>
- Patino, L. H., & Ramirez, J. D. (2017). RNA-seq in kinetoplastids: A powerful tool for the understanding of the biology and host-pathogen interactions. *Infection, Genetics and Evolution*, 49, 273–282. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.02.003>
- Pavey, S. A., Bernatchez, L., Aubin-Horth, N., & Landry, C. R. (2012). What is needed for next-generation ecological and evolutionary genomics? *Trends in Ecology & Evolution*, 27(12), 673–678. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.07.014>
- Perrier, C., Ferchaud, A.-L., Sirois, P., Thibault, I., & Bernatchez, L. (2017). Do genetic drift and accumulation of deleterious mutations preclude adaptation? Empirical investigation using RADseq in a northern lacustrine fish. *Molecular Ecology*, 26(22), 6317–6335. <https://doi.org/10.1111/mec.14361>

- Peterson, B. K., Weber, J. N., Kay, E. H., Fisher, H. S., & Hoekstra, H. E. (2012). Double digest radseq: An inexpensive method for de novo snp discovery and genotyping in model and non-model species. *PLoS ONE*, 7(5), e37135. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037135>
- Phillips, S. J., Anderson, R. P., & Schapire, R. E. (2006). Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling*, 190(3–4), 231–259. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2005.03.026>
- Pinheiro, R. T., & Dornas, T. (2009). Distribuição e conservação das aves na região do Cantão, Tocantins: Ecótono Amazônia/Cerrado. *Biota Neotropica*, 9(1), 187–205. <https://doi.org/10.1590/S1676-06032009000100019>
- Pironon, S., Papuga, G., Vilellas, J., Angert, A. L., García, M. B., & Thompson, J. D. (2017). Geographic variation in genetic and demographic performance: New insights from an old biogeographical paradigm: The centre-periphery hypothesis. *Biological Reviews*, 92(4), 1877–1909. <https://doi.org/10.1111/brv.12313>
- Polechová, J., & Barton, N. H. (2015). Limits to adaptation along environmental gradients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(20), 6401–6406. <https://doi.org/10.1073/pnas.1421515112>
- R a language and environment for statistical computing: Reference index. (2010). R Foundation for Statistical Computing.
- Ratter, J. (1997). The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. *Annals of Botany*, 80(3), 223–230. <https://doi.org/10.1006/anbo.1997.0469>
- Rellstab, C., Gugerli, F., Eckert, A. J., Hancock, A. M., & Holderegger, R. (2015). A practical guide to environmental association analysis in landscape genomics. *Molecular Ecology*, 24(17), 4348–4370. <https://doi.org/10.1111/mec.13322>
- Rhie, A., McCarthy, S. A., Fedrigo, O., Damas, J., Formenti, G., Koren, S., Uliano-Silva, M., Chow, W., Fungtammasan, A., Kim, J., Lee, C., Ko, B. J., Chaisson, M., Gedman, G. L., Cantin, L. J., Thibaud-Nissen, F., Haggerty, L., Bista, I., Smith, M., ... Jarvis, E. D. (2021). Towards complete and error-free genome assemblies of all vertebrate species. *Nature*, 592(7856), 737–746. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03451-0>
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010). Edger: A bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139–140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>
- Rochette, N. C., Rivera-Colón, A. G., & Catchen, J. M. (2019). Stacks 2: Analytical methods for paired-end sequencing improve RADseq-based population genomics. *Molecular Ecology*, 28(21), 4737–4754. <https://doi.org/10.1111/mec.15253>
- Rodrigues, M. T. (1987). Sistemática, ecologia e zoogeografia dos *Tropidurus* do grupo *Torquatus* ao sul do Rio Amazonas (Sauria, Iguanidae). *Arquivos de Zoologia*, 31(3), 105. <https://doi.org/10.11606/issn.2176-7793.v31i3p105-230>
- Rull, V. (2011). Neotropical biodiversity: Timing and potential drivers. *Trends in Ecology & Evolution*, 26(10), 508–513. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2011.05.011>
- Sartorius, S. S., Vitt, L. J., & Colli, G. R. (1999). Use of naturally and anthropogenically disturbed habitats in Amazonian rainforest by the teiid lizard *Ameiva ameiva*. *Biological Conservation*, 90(2), 91–101. [https://doi.org/10.1016/S0006-3207\(99\)00019-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3207(99)00019-1)
- Scalon, M. C., Rossatto, D. R., Oliveras, I., Miatto, R. C., Gray, E. F., Domingos, F. M. C. B., Brum, F. T., Carlucci, M. B., Hoffmann, W. A., Marimon-Júnior, B. H., Marimon, B. S., & Franco, A. C. (2021). Fire and drought: Shifts in bark investment across a broad geographical scale for Neotropical savanna trees. *Basic and Applied Ecology*, 56, 110–121. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2021.06.011>
- Sinervo, B., Méndez-de-la-Cruz, F., Miles, D. B., Heulin, B., Bastiaans, E., Villagrán-Santa Cruz, M., Lara-Resendiz, R., Martínez-Méndez, N., Calderón-Espinosa, M. L., Meza-Lázaro, R. N., Gadsden, H., Avila, L. J., Morando, M., De la Riva, I. J., Victoriano Sepulveda, P., Rocha, C. F. D., Ibarquengoytia, N., Aguilar Puntriano, C., Massot, M., ... Sites, J. W. (2010). Erosion of lizard diversity by climate change and altered thermal niches. *Science (New York, N.Y.)*, 328(5980), 894–899. <https://doi.org/10.1126/science.1184695>
- Sitch, S., Huntingford, C., Gedney, N., Levy, P. E., Lomas, M., Piao, S. L., Betts, R., Ciais, P., Cox, P., Friedlingstein, P., Jones, C. D., Prentice, I. C., & Woodward, F. I. (2008). Evaluation of the terrestrial carbon cycle, future plant geography and climate-carbon cycle feedbacks using five Dynamic Global Vegetation Models (Dgvm): UNCERTAINTY IN LAND CARBON CYCLE FEEDBACKS. *Global Change Biology*, 14(9), 2015–2039. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2008.01626.x>
- Skeels, A., Esquerré, D., & Cardillo, M. (2020). Alternative pathways to diversity across ecologically distinct lizard radiations. *Global Ecology and Biogeography*, 29(3), 454–469. <https://doi.org/10.1111/geb.13044>
- Smith, T. B., Kark, S., Schneider, C. J., Wayne, R. K., & Moritz, C. (2001). Biodiversity hotspots and beyond: The need for preserving environmental transitions. *Trends in Ecology & Evolution*, 16(8), 431. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(01\)02201-7](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(01)02201-7)
- Smith, T. B., Wayne, R. K., Girman, D. J., & Bruford, M. W. (1997). A role for ecotones in generating rainforest biodiversity. *Science*, 276(5320), 1855–1857. <https://doi.org/10.1126/science.276.5320.1855>
- Terblanche, J. S., Deere, J. A., Clusella-Trullas, S., Janion, C., & Chown, S. L. (2007). Critical thermal limits depend on methodological context. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1628), 2935–2943. <https://doi.org/10.1098/rspb.2007.0985>
- Todd, E. V., Black, M. A., & Gemmill, N. J. (2016). The power and promise of RNA-seq in ecology and evolution. *Molecular Ecology*, 25(6), 1224–1241. <https://doi.org/10.1111/mec.13526>
- Tucker, D. (2016). Molecular studies of south american teiid lizards (Teiidae: Squamata) from deep time to shallow divergences. <https://www.semanticscholar.org/paper/Molecular-Studies-of-South-American-Teiid-Lizards-Tucker/f7ca31e14ab635ce0d57dfe0bd6394918d4b35e1>
- Van Rensburg, B. J., Levin, N., & Kark, S. (2009). Spatial congruence between ecotones and range-restricted species: Implications for conservation biogeography at the sub-continental scale. *Diversity and Distributions*, 15(3), 379–389. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4642.2008.00545.x>

Van Sluys, M. (2000). Population dynamics of the saxicolous lizard *Tropidurus itambere* (Tropiduridae) in a seasonal habitat of southeastern Brazil. *Herpetologica*, 56(1), 55–62. <https://www.jstor.org/stable/3893127>

Vitt, L. J., & Colli, G. R. (1994). Geographical ecology of a Neotropical lizard: *Ameiva ameiva* (Teiidae) in Brazil. *Canadian Journal of Zoology*, 72(11), 1986–2008. <https://doi.org/10.1139/z94-271>

Werneck, F. P. (2011). The diversification of eastern South American open vegetation biomes: Historical biogeography and perspectives. *Quaternary Science Reviews*, 30(13–14), 1630–1648. <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2011.03.009>

Werneck, F. P., Nogueira, C., Colli, G. R., Sites, J. W., & Costa, G. C. (2012). Climatic stability in the Brazilian Cerrado: Implications for biogeographical connections of South American savannas, species richness and conservation in a biodiversity hotspot: Climatic stability and biodiversity in the Cerrado. *Journal of Biogeography*, 39(9), 1695–1706. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2012.02715.x>

Yang, Y., Wang, L., Han, J., Tang, X., Ma, M., Wang, K., Zhang, X., Ren, Q., Chen, Q., & Qiu, Q. (2015). Comparative transcriptomic analysis revealed adaptation mechanism of *Phrynocephalus erythrurus*, the highest altitude lizard living in the Qinghai-Tibet Plateau. *BMC Evolutionary Biology*, 15(1), 101. <https://doi.org/10.1186/s12862-015-0371-8>

Zhen, Y., Harrigan, R. J., Ruegg, K. C., Anderson, E. C., Ng, T. C., Lao, S., Lohmueller, K. E., & Smith, T. B. (2017). Genomic divergence across ecological gradients in the Central African rainforest songbird (*Ampelis garrulus*). *Molecular Ecology*, 26(19), 4966–4977. <https://doi.org/10.1111/mec.14270>