

**Sergio Marques de Souza**

**Moléculas, morfologia e geologia: uma abordagem multidisciplinar para entender a história evolutiva de lagartos do gênero *Loxopholis* (Squamata: Gymnophthalmidae) no norte da América do Sul.**

**Molecules, morphology and geology: a multidisciplinary approach to understand the evolutionary history of *Loxopholis* (Squamata: Gymnophthalmidae) lizards in the north of South America**

**São Paulo**

**2016**

**Sergio Marques de Souza**

**Moléculas, morfologia e geologia: uma abordagem multidisciplinar para entender a história evolutiva de lagartos do gênero *Loxopholis* (Squamata: Gymnophthalmidae) no norte da América do Sul.**

**Molecules, morphology and geology: a multidisciplinary approach to understand the evolutionary history of *Loxopholis* (Squamata: Gymnophthalmidae) lizards in the north of South America**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Doutor em Ciências, na Área de Zoologia.

Orientador(a): Dr. Miguel Trefaut Rodrigues

**São Paulo**

**2016**

Marques de Souza, Sergio  
Moléculas, morfologia e geologia: uma abordagem multidisciplinar para entender  
a história evolutiva de lagartos do gênero *Loxopholis* (Squamata:  
Gymnophthalmidae) no norte da América do Sul.

184 páginas

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.  
Departamento de Zoologia

1. Amazônia 2. Biogeografia 3. Sistemática I. Universidade de São Paulo.  
Instituto de Biociências. Departamento de Zoologia

## Comissão Julgadora:

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

Orientador(a)

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar, agradeço imensamente ao meu orientador Miguel Trefaut Rodrigues, por todo o apoio, confiança, incentivo, campos e partilha de conhecimento que tive com ele durante esses 10 anos, desde que o contactei para ser meu co-orientador durante meu mestrado em Manaus. É um privilégio poder contar com uma bagagem tão grande de conhecimento ao meu lado a qualquer hora que eu resolvesse bater na porta de sua salinha.

Agradeço muito também a minha co-orientadora, Katia Pellegrino, por todas as conversas, sugestões, dicas, explicações e conhecimentos compartilhados, principalmente sobre os enigmáticos *Loxopholis osvaldoi*, e por compartilhar comigo todo seu profundo conhecimento de sistemática molecular. Aprendi muito!

Agradeço também aos meus amigos(as) e companheiros(as) de laboratório, que tanto me ajudaram durante essa caminhada de 4 anos, com análises, conversas, risadas, descontração e coletas em campo: Mauro, Agustin, Recoder, Marco Sena, Renata Cecília, Pedro Nunes, Roberta Damasceno, Mayra, Federico Arias, Francisco “Chico” Dal Vechio, Juliana Roscito, Felipão, Cassimiro, José Mário, Ivan Prates, Carolina Nisa, Maysa, Veridiana, Bruna “Paps” e Tuliana Brunes. Será sempre uma honra dividir o laboratório com pessoas tão especiais.

A Sabrina Baroni, meu profundo agradecimento por me ensinar os primeiros passos em um laboratório de molecular, literalmente essa tese não existiria sem você. Ao Manuel e a Bia, que também muito me ajudaram, meu obrigado! Vocês são um baita time! A Nathalia e a Lílian, meu super agradecimento por sequenciar metade do conjunto de dados da filogeografia de *L. osvaldoi*.

Também agradeço a Ana Carolina Carnaval e a todo o pessoal de seu lab na CUNY pelas conversas e conselhos, principalmente a Maria Strangas e Brandon, além de todas as pessoas que participaram dos interessantes

encontros do projeto AF-BIOTA, onde aprendi bastante. Aos amig(a)s e colegas de Departamento, com os quais também aprendi bastante e passei bons momentos: Mariane Targino, Rachel Montesinos, Rafa, Gabriel, Roberta Grabowski, Gringo, Denis Machado, Julia Beneti, Pedro Dias, Jhon Jairo e Adriana Jeckel.

Ao longo de mais de 10 anos de viagens de campo para coleta de espécimes na Amazônia, tive a oportunidade, única eu diria, de conhecer pessoas muito especiais, que me ensinaram muito em relação a vida e a vida do Amazônída. Foram muitas viagens, e enumerar todas as as pessoas aqui envolvidas seria inviável. Dessa forma, cito algumas, mas agradeço a todos que ajudaram e participaram das muitas etapas de campo envolvidas neste trabalho: Mario Cohn-Haft (também pela orientação com *L. osvaldoi* no mestrado), Fabio Röhe, Alexandre Fernandes (com quem coletei minhas primeiras amostras em 2006), Vinicius Carvalho, Deyla Oliveira, Alexandre Almeida, Tomas Hrbek, Antoine Fouquet, Santiago Sanchez-Pacheco, Juruna, Luciana Frazão, Juliana Vieira, entre outros.

Agradeço aos Profs. Taran Grant, Ward Wheller, Alexandre Adalardo, Silvio Nihei, Luís Fábio Silveira, Cristina Miyaky por todo o conhecimento transferido.

A todos meus amigos-irmãos-família com quem tive a honra de dividir caminhos, idéias, risadas, tristezas, alegrias e momentos que me fizeram chegar até esse ponto de minha vida, seja em Manaus ou em Sampa: Manoela Borges, Gabi Zuquim, Catá Jacovack, Dé Junqueira, Saci, Minduca, Trupico, Thayná, Brunão Luize, Carlota Bantel, Beto Vicentini, Cintia, Zé Luis, Pardal e Ana, Flavia Pezzini, Dadão e Marininha, Rosinha, Ana Andrade, Angelita, Ana Lúcia, JB, e por aí segue o povo manauara....Em Sampa: Noni, Paulomanos, Gabriel Birú, Dani Soltys, Caule Awade, Paulinho, Pan, Paulinha, Sara, Melina, e outros não menos especiais (a lista é quase infinita...). Agradecimento especial a amiga Teresa Thomé, Tetê, pela amizade, conversas e dicas sobre filogeografia e por servir de exemplo!

Agradeço especialmente a Manô, por todos os momentos vividos durante esses 10 anos, que foram muito importantes para mim e por ter paciência comigo nas horas difíceis desse processo.

A minha família querida, Marco, Marisa, Vanessa, Alessandra, Gustavo e Edú, que sempre me apoiaram incondicionalmente no caminho que eu queria seguir, e me deram todas as condições para eu chegar hoje aqui, sempre com muito amor e união.

Agradeço aos seguintes pessoas das instituições que gentilmente colaboraram com meu projeto, me cedendo alíquotas de tecido ou autorizando a visita as coleções científicas: Ana Prudente, Fabrício Sarmiento, Teresa C.S. Avila-Pires e Marcelo Sturaro (MPEG), Hussam Zaher, Carolina Mello, Beto, Felipe Grazziotin e André (MZUSP), Richard Vogt, Fernanda Werneck, Vinícius Carvalho, Lucéia Bonora, Camila Ribas e Albertina Lima (INPA), Felipe Curcio (UFMT), Laurie Vitt, Donna Ditmann (LSU), Antoine Fouquet (CNRS), Marco Altamirano (DHMECN), David Kizirian (AMNH), Jose Rosado (MCZ), Alfredo Guzman (MHNSM), Pablo Venegas, German Chavez, Andy Barboza, Juan Arribasplata (CORBIDI), Jhon Lynch, Sandy Arroyo (ICN).

Agradeço a FAPESP por todo o apoio financeiro e pela bolsa durante esses 4 anos (processo 2012/10163-1) e ao CNPq, pela bolsa concedida no início deste projeto.

Finalmente, agradeço e dedico esta tese a todos que lutam para conhecer e preservar a biodiversidade e os ambientes amazônicos, brasileiros e mundiais.  
Boa leitura!

## Índice

Capítulo 1. Introdução Geral.....	9
1.1. O gênero <i>Loxopholis</i> no norte da América do Sul.....	1
1.2. Breve revisão taxonômica de <i>Loxopholis</i> .....	3
1.3. Resumo da história das paisagens da região norte da América do Sul no Neogeno.....	5
1.3.1. Cenário geológico.....	5
1.3.2. Desenvolvimento da Floresta Amazônica.....	7
1.4. Referências Bibliográficas.....	8
Capítulo 2. Distribuição, taxonomia, sistemática e biogeografia do gênero <i>Loxopholis</i> no norte da América do Sul.....	15
Resumo.....	16
Abstract.....	16
2.1. Introdução.....	17
2.1.1. Refúgios, rios e arcos tectônicos: diferentes hipóteses de diversificação na Amazônia.....	18
2.1.2. O gênero <i>Loxopholis</i> e sua relação com a evolução da paisagem do norte da América do Sul.....	20
2.2. Materiais e Métodos.....	22
2.2.1. Delimitação da distribuição geográfica de <i>Loxopholis</i> .....	22
2.2.2. Amostragem morfológica.....	23
2.2.3. Amostragem molecular.....	24
2.2.4. Análises filogenéticas e estimativas de tempo de divergência.....	26
2.3. Resultados.....	29
2.3.1. Distribuição geográfica.....	29
2.3.2. Variação morfológica em <i>Loxopholis</i> .....	30
2.3.3. Relações filogenéticas.....	32
2.3.4. Tempos de divergência.....	33
2.4. Discussão.....	34
2.4.1. Distribuição das espécies de <i>Loxopholis</i> .....	34
2.4.2. Variação morfológica em <i>Loxopholis</i> .....	36
2.4.3. Relações filogenéticas em <i>Loxopholis</i> .....	37
2.4.4. Um modelo para explicar a história evolutiva de <i>Loxopholis</i> .....	39
2.5. Referências bibliográficas.....	44
2.6. Figuras.....	55
2.7. Tabelas.....	71
Capítulo 3. Análises filogeográficas e de delimitação de espécies em um lagarto de folhiço da Amazônia ( <i>Loxopholis osvaldoi</i> : Gymnophthalmidae): processos evolutivos, diversidade críptica e implicações para a conservação.....	83
Resumo.....	84
Abstract.....	84
3.1. Introdução.....	85
3.2. Materiais e métodos.....	87



3.2.1. Amostragem.....	88
3.2.2. Procedimentos laboratoriais e edição de sequências.....	88
3.2.3. Análises filogenéticas e genealogias de haplótipos.....	90
3.2.4. Árvore de espécies.....	91
3.2.5. Isolamento por distância.....	92
3.2.6. Delimitação de espécies.....	93
3.2.6.1. STRUCTURE.....	93
3.2.6.2. Bayesian Phylogenetics and Phylogeography (BPP).....	95
3.2.6.3. Filogenia dos organismos por dados alélicos (POFAD).....	96
3.2.7. Análises morfológicas.....	96
3.3. Resultados.....	97
3.3.1. Diversidade haplotípica e estatísticas populacionais.....	97
3.3.2. Análises filogenéticas e distâncias genéticas.....	98
3.3.3. Potenciais casos de hibridizações.....	99
3.3.4. Árvore de espécies.....	101
3.3.5. Isolamento por distância.....	101
3.3.6. Delimitação de espécies.....	102
3.3.6.1. STRUCTURE.....	102
3.3.6.2. BPP.....	102
3.3.6.3. POFAD.....	103
3.3.7. Análises morfológicas.....	104
3.4. Discussão.....	104
3.4.1. Estrutura filogeográfica: processos e manutenção.....	104
3.4.2. Relações filogenéticas.....	106
3.4.3. Padrões geográficos de distribuição.....	107
3.4.4. Delimitação de espécies e diversidade críptica em <i>L. osvaldoi</i> .....	108
3.4.5. Conservação.....	111
3.5. Referências bibliográficas.....	112
3.6. Figuras.....	124
3.7. Tabelas.....	142
4. Considerações finais.....	150
Resumo Geral.....	152
General abstract.....	152
5. Apêndices.....	154

A photograph of a moss-covered tree trunk in a forest. The tree trunk is covered in a thick layer of green moss. A small plant with long, narrow, green leaves is growing from the moss on the trunk. The background is a dense forest with many green leaves and branches.

## Capítulo 1

## Introdução Geral

### 1.1. O gênero *Loxopholis* no norte da América do Sul

Lagartos do gênero *Loxopholis* são componentes conspícuos da herpetofauna das florestas tropicais da América do Sul e da América Central (UZZEL & BARRY, 1971; RODRIGUES & AVILA-PIRES, 2005), sendo pequenos (aproximadamente 35 mm de comprimento rostro-cloacal máximo) e habitantes da camada de folhiço do ambiente florestal. As espécies do gênero ocorrem nas florestas da porção norte da América do Sul e América Central, se estendendo da Amazônia até a Costa Rica (RUIBAL 1952; AVILA-PIRES, 1995; RODRIGUES & AVILA-PIRES, 2005), no entanto, devido a grande extensão geográfica da área de distribuição, por ocorrerem em regiões remotas do norte da América do Sul, e dificuldades na identificação taxonômica, pouco se sabe sobre os limites de distribuição das espécies. No entanto, sabe-se que o gênero apresenta uma alta fidelidade com o ambiente florestal úmido, não ocorrendo no Cerrado, apesar da grande extensão de habitats teoricamente propícios para sua ocorrência, como as amplas florestas de galerias do Brasil Central (PELLEGRINO *et al.*, 2011).

O gênero *Loxopholis sensu* GOICOCHEA e col. 2016 assume 13 espécies descritas (*Loxopholis rugiceps* COPE, 1868; *L. parietalis* COPE, 1886; *L. percarinatum* MÜLLER, 1923; *L. southi* RUTHVEN & GAIGE, 1924; *L. guianense* RUIBAL, 1952; *L. ioanna* UZZEL & BARRY, 1971; *L. hexalepis* AYALA & HARRIS, 1982; *L. osvaldoi* AVILA-PIRES, 1995; *L. snethlageae* AVILA-PIRES, 1995; *L. caparensis* ESQUEDA, 2005; *L. ferreirai* RODRIGUES & AVILA-PIRES, 2005; *L. guianensis* MACCULLOCH & LATHROP, 2001; *L. hoogmoedi* KOK, 2008). Essa configuração agrupa espécies anteriormente classificadas no gênero *Leposoma* gr. *parietale* (ver histórico taxonômico abaixo) e duas espécies anteriormente classificadas no gênero *Arthrosaura*, *L. guianensis* e *L. hoogmoedi*. No entanto, evidências recentes (Katia C.M. Pellegrino com. pess. e capítulo 2 desta tese) indicam que *Loxopholis sensu* Goicochea e col. 2016 representa um agrupamento parafilético em relação ao gênero *Amapasaurus*, não incluído em Goicochea e col. 2016. Mais especificamente, *Amapasaurus* se apresenta como grupo irmão do antigo grupo *parietale*, excluindo as espécies antigamente classificadas em *Arthrosaura*, *L. guianensis* e *L. hoogmoedi*. Evidências morfológicas

confirmam esse cenário, de forma que, neste trabalho, adotamos uma postura restritiva quanto ao gênero *Loxopholis*, considerando apenas as espécies anteriormente classificadas no antigo grupo *parietale*, ou seja, 11 espécies (*L. rugiceps*, *L. parietalis*, *L. percarinatum*, *L. southi*, *L. guianense*, *L. ioanna*, *L. hexalepis*, *L. osvaldoi*, *L. snethlageae*, *L. caparensis* e *L. ferreirai*). Essas espécies, no entanto, carecem de uma revisão taxonômica aprofundada. As últimas revisões foram realizadas por RUIBAL (1952), UZZEL & BARRY (1971) e por AVILA-PIRES (1995), esta última apenas para as espécies brasileiras. O gênero também carece de uma hipótese filogenética que leve em conta toda sua diversidade. As filogenias disponíveis (PELLEGRINO *et al.* 2011; PYRON *et al.*, 2013; GOICOCHEA *et al.*, 2016) incluíram apenas parte das 11 reconhecidas. Nesse trabalho, ampliamos a amostragem de espécies e propomos uma hipótese filogenética para *Loxopholis* baseada em uma análise *multilocus*, com marcadores mitocondriais e nucleares. Adicionalmente, detalhamos a distribuição e a variação morfológica das espécies com base em análises a espécimes em museus, e propomos um modelo para a evolução do gênero *Loxopholis* no norte da América do Sul, a partir de uma revisão dos trabalhos geológicos, geomorfológicos e paleoclimáticos que tratem sobre a região (Capítulo 2).

Algumas evidências indicam que algumas espécies de *Loxopholis* representam na verdade complexo de espécies (AVILA-PIRES, 1995; NUNES, 2011, PELLEGRINO *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2013). Através da análise da morfologia hemipeniana, NUNES (2011) sugeriu a possibilidade de *L. guianense* abrigar mais de uma linhagem. A partir da análise morfométrica das escamas cefálicas em *L. osvaldoi*, SOUZA (2013) encontrou evidências de que populações de lados opostos do alto Rio Aripuanã pertencem a linhagens evolutivas distintas. Ainda, PELLEGRINO e col., 2011 sugerem, com base em análises moleculares, que populações de *L. guianense* que ocorrem na região de Manaus sejam na verdade mais relacionadas a *L. osvaldoi*. Sendo assim, investigamos o *status* taxonômico de *L. osvaldoi* a partir de uma detalhada análise de delimitação de espécies com evidências morfológicas e moleculares (Capítulo 3).

Outra espécie que provavelmente representa um complexo de espécies é *L. percarinatum*, que se diferencia das demais espécies de *Loxopholis* por ser a única

espécie partenogenética reconhecida, onde só fêmeas são conhecidas (UZZEL & BARRY, 1971). Até o momento, foram encontradas duas linhagens evolutivas distintas em *L. percarinatum*, diagnosticadas a partir de cariótipo (PELLEGRINO *et al.*, 2003; LAGUNA *et al.*, 2010) e dados moleculares (PELLEGRINO *et al.*, 2011). Nessa tese, investigamos a variação morfológica presente em *L. percarinatum*, mas precisamente descrevendo a primeira população bissexual atribuída a este táxon, realizando um teste de hipótese sobre sua classificação e apresentando *insights* sobre as implicações do achado para o aparecimento da partenogênese em *Loxopholis*. O trabalho com *L. percarinatum* foi publicado na revista *South American Journal of Herpetology* e se encontra no apêndice 1 desta tese.

Apresentamos ainda (abaixo) um breve histórico das mudanças taxonômicas as quais os atuais integrantes do gênero foram submetidos. Ainda, tendo em vista que a história evolutiva de *Loxopholis* é antiga e se desenrolou durante o Neogeno (23-2.5 milhões de anos atrás) (ver Capítulo 3), apresentamos também nesta introdução um resumo da história geológica e das mudanças da paisagem do norte da América do Sul durante esse período.

## **1.2. Breve revisão taxonômica de *Loxopholis***

O gênero *Loxopholis* foi proposto por COPE (1868) para acomodar *Loxopholis rugiceps*, com base em exemplar de New Grenada, região do Rio Magdalena, atual Colômbia. Já o nome *Leposoma* foi proposto por SPIX (1825), a partir da descrição de *Leposoma scincoides* com base em exemplares provenientes do Rio Amazonas. A ausência desta espécie na região do Rio Amazonas levou a conclusão que esse material estava com a localidade errada (AVILA-PIRES, 1995), sendo provavelmente proveniente do sudeste do Brasil. A distinção entre *Loxopholis* e *Leposoma* era baseada nos escudos ventrais, quilhados em *Leposoma* e lisos em *Loxopholis*.

COPE (1886) propôs o gênero *Mionyx* para acomodar a espécie *Mionyx parietale*, descrita a partir de exemplares de uma coleção feita em Pebas, alto rio Amazonas, Perú. A descrição levou em conta o arranjo de Teiidae proposto pelo autor (COPE, 1886), que utilizou principalmente as garras dos dedos e escamas cefálicas como características classificatórias, separando os gêneros em três categorias: dedos

sem garras (*Iphisa*), dedos com garras, porém retas e cônicas (*Mionyx*) e dedos com garras curvas (*Neusticurus*, *Placosoma*, *Leposoma*, *Proctoporus* e *Emphrassiotis*). Nesse arranjo, Cope fornece uma definição ampla para *Leposoma*, incluindo espécies de 10 gêneros na sinonímia de *Leposoma* (*Loxopholis*, *Cercosaura*, *Pantodactylus*, *Ecleopus*, *Aspidolaemnus*, *Euspondylus*, *Argalia*, *Chalcidolepis*, *Xestosaurus* e *Pristidactylus*), resultando em 28 espécies. Este arranjo de Teiidae difere bastante do proposto um ano antes por BOULENGER (1885), onde *Leposoma* possui apenas duas espécies, *L. scincoides* e *L. dispar*. Entretanto, a composição de Teiidae *sensu* BOULENGER (1885) prevaleceu na literatura.

Após a descrição de *Hylosaurus percarinatus* (MÜLLER, 1923) e *Leposoma southi* (RUTHVEN & GAIGE, 1924), o próximo trabalho a revisar a taxonomia de *Leposoma* foi RUIBAL (1952), com importantes contribuições. Primeiramente descreveu *Leposoma annectans* e propôs pela primeira vez a divisão de *Leposoma* em dois grupos de espécies: grupo *scincoides* (*L. annectans* e *L. scincoides*) e grupo *parietale* (todas as outras espécies descritas na época). Neste trabalho RUIBAL (1952) também descreve *Leposoma guianense* e inclui os gêneros *Loxopholis* e *Mionyx* na sinonímia de *Leposoma*, além de sinonimizar *Leposoma dispar* (PETERS, 1880) com *L. rugiceps*.

A revisão de *Leposoma* realizada por UZZEL & BARRY (1971) é baseada em uma análise quantitativa sobre a forma dos escudos cefálicos. Essa análise permitiu levantar caracteres diagnósticos entre *L. guianense*, *L. parietale* e *L. percarinatum*, além do reconhecimento de um táxon novo, *Leposoma ioanna* proveniente da porção leste dos Andes Colombianos. Além disso, UZZEL & BARRY (1971) propuseram a provável ocorrência de partenogênese em *L. percarinatum* devido à grande disparidade encontrada na razão sexual desta espécie, onde apenas fêmeas são conhecidas. Posteriormente, AYALA & HARRIS (1982) descrevem *Leposoma hexalepis*, com base em exemplares da Venezuela e AVILA-PIRES (1995), revisando *Leposoma* na Amazônia Brasileira, descreve duas espécies que ocorrem ao sul do Rio Amazonas, *Leposoma osvaldoi* e *Leposoma sneathlageae*. Ao analisar exemplares da porção leste da Venezuela, ESQUEDA (2005) descreve *Leposoma caparensis* e RODRIGUES & AVILA-PIRES (2005) descrevem *Leposoma ferreirai*, espécie endêmica do Arquipélago

das Anavilhanas, Amazonas. Por fim, com base em uma análise molecular, Goicochea e col. 2016 retiraram *Loxopholis* da sinonímia com *Leposoma*, restringindo as espécies do grupo *parietale* sensu RUIBAL (1952) a esse gênero, e adicionando a *Loxopholis* também duas espécies classificadas em *Arthrosaura*, *L. guianensis* e *L. hoogmoedi*.

### **1.3. Resumo da história das paisagens da região norte da América do Sul no Neogeno**

#### **1.3.1. Cenário geológico**

A região Amazônica pode ser dividida em duas grandes feições geológicas: os escudos pré-cambrianos, situados a leste de Manaus, e a bacia sedimentar Amazônica, na porção oeste. Tanto o Escudo das Guianas (norte do rio Amazonas) quanto o Escudo do Brasil Central (sul do rio Amazonas) permaneceram relativamente estáveis geologicamente durante o Neogeno (ALEIXO & ROSSETI, 2007; IRION & KALLIOLA, 2010), em grande parte devido à sua natureza cristalina. Já à porção do cráton amazônico a oeste de Manaus foi cenário de intensa e dinâmica atividade geológica durante o mesmo período (HOORN *et al.*, 1995; VONHOF *et al.*, 1998; ALEIXO & ROSSETI, 2007; HOORN *et al.* 2010a).

A grande dinâmica paleogeográfica deste período se deve, principalmente, ao soerguimento dos Andes, que teve início no Cretáceo e, aparentemente, avançou do sul para o norte e de oeste para leste, de maneira não contínua, com episódios de rápida orogenia (GARZIONE *et al.*, 2008). Nas porções central e norte dos Andes, responsáveis pelas principais modificações no norte da América do Sul, a maior parte do soerguimento ocorreu durante o Mioceno (ca. 30-10 Ma), com trechos da Cordilheira Leste no norte do Andes sendo soerguidas tão recentemente quanto 2-5 Ma (MORA *et al.*, 2010).

No entanto, por volta do fim do período Paleogeno e início do Neogeno (23 Ma), o soerguimento dos Andes Central e Norte era incipiente, de forma que a influência dos rios intracratônicos (i.e. provenientes dos Escudos das Guianas e do Brasil Central) na Amazônia era ainda grande (WESSELINGH *et al.*, 2010). Os rios que drenavam dos Andes incipientes e os que drenavam os dois escudos cristalinos se juntavam no sopé dos Andes, correndo no sentido sul-norte e desaguardo no Caribe (HOORN *et al.*,

2010b; WESSELINGH *et al.*, 2010). Esse sistema de drenagem sub-andino existiu em decorrência da formação de uma bacia de frente de cadeia (foreland basin), (RODDAZ *et al.*, 2010). Esse sistema era delimitado a leste pelo Arco do Purus (Figura 1), situado na Amazônia Central, a oeste de Manaus, hoje soterrado (BRITO-NEVES, 2002; FIGUEIREDO *et al.*, 2009). O mesmo Arco do Purus delimitava a oeste a bacia do Proto-Amazonas, que corria em direção ao Atlântico e drenava as porções leste dos escudos cristalinos (ver pranchas em HOORN & WESSELINGH, 2010 e HOORN *et al.*, 2010a).

Os contínuos episódios de orogênese andina ao longo do Mioceno causaram diversas alterações ambientais nas terras baixas amazônicas a leste, de origem estrutural (e.g. arcos), estratigráfica (e.g. sedimentação) e climática. Durante o Mioceno Inferior, o crescimento de altitude dos Andes gerou um aumento de intensidade das chuvas orográficas na vertente leste (FIGUEIREDO *et al.*, 2009; MORA *et al.*, 2010; HOORN *et al.* 2010a; 2010c; SACEK, 2014). Essa alta taxa de precipitação, associada ao aumento da carga gerada pela orogenia dos Andes (acentuando a bacia de frente de cadeia), afogou o sistema fluvial sub-andino e deu origem ao Lago Pebas, um mega-complexo de lagos e pântanos que, no ápice de sua extensão (Mioceno Médio, c.a. 16-11 Ma), chegou a ter 1.5 milhões de Km<sup>2</sup> ocupando quase todas as terras baixas do oeste amazônico (HOORN *et al.* 2010c). Esse ambiente fluvio-lacustre e lacustre, sujeito a repetidos e rápidos episódios de introgressões marinhas (HOVIKOSKI *et al.*, 2010), foi o palco para a diversificação de uma excepcional fauna endêmica de invertebrados (moluscos e ostracodes) e crocodilianos (WESSELINGH *et al.*, 2006; WESSELINGH & RAMOS, 2010, RIFF *et al.*, 2010), hoje em grande parte extinta.

Durante o Mioceno Superior (c.a. 11-5 Ma), um novo episódio de soerguimento da cordilheira Leste (Norte dos Andes) e dos Andes Venezuelanos (cordilheira de Mérida) influenciou drasticamente a hidrografia do norte da América do Sul, fechando a conexão do sistema Pebas com o Caribe, formando a proto-bacia do Orinoco e compartimentalizando a bacia do Rio Magdalena (HOORN *et al.*, 2010a). Os Andes Centrais também sofreram episódios de soerguimento durante esta época, aumentando ainda mais o aporte de sedimentos no sopé dos Andes. Este grande aporte de



sedimentos foi responsável por mudar a orientação do relevo no sentido oeste-leste (MORA *et al.*, 2010; RODDAZ *et al.*, 2010; HOORN *et al.*, 2010b), o que gerou, por volta de 11 Ma, o estabelecimento do tronco hidrúco que hoje é o rio Amazonas-Solimões, no entanto ainda apresentando características fluvio-lacustres (HOORN *et al.*, 1995; FIGUEIREDO *et al.*, 2009; HOORN *et al.*, 2010a). Eventualmente, com novos episódios intensos de soerguimento andino por volta de 7,0 Ma, ocorre o desenvolvimento de características fluviais do rio Amazonas (HOORN *et al.*, 2010a). O Arco Vaupés, que delimita o norte da bacia do rio Amazonas e a separa da bacia do Orinoco até os dias atuais, surgiu durante a transição do período Mioceno para o Plioceno (ca. 5,0 Ma) (MORA *et al.*, 2010). Já o limite sul da bacia amazônica também foi definido durante o Plioceno, com a formação do Arco Fitzcarrald, decorrente da subducção da cadeia de montanhas oceânica de Nazca (ESPURT *et al.*, 2010).

### **1.3.2. Desenvolvimento da Floresta Amazônica**

De maneira geral, reconhece-se que a Floresta Amazônica é muito antiga, já que, por volta do Paleoceno (66-56 Ma) podemos reconhecer a mesma composição filogenética básica das florestas recentes (VAN DER HAMMEN & HOOGHIEMSTRA, 2000; JARAMILLO *et al.*, 2006; JARAMILLO *et al.*, 2010). O aumento de temperatura durante o período Eoceno (56-34 Ma - Figura 2) elevou a diversidade florística até níveis mais altos que os atuais no “Eocene Thermal Maximum”, seguida de uma queda abrupta durante o Oligoceno (34-23 Ma), que novamente acompanhou o resfriamento global (ZACHOS *et al.*, 2001; JARAMILLO ., 2006). Análises de microfósseis botânicos (HOORN, 1994; PONS & DE FRANCESCHI, 2007; JARAMILLO *et al.*, 2010) indicam que a composição florística presente na Amazônia durante o Ótimo Climático Miocênico era muito semelhante à encontrada atualmente, mesmo em nível genérico, e que, provavelmente, a área ocupada por florestas diminuiu com o resfriamento global ocorrido durante o Mioceno Médio-Plioceno, posteriormente se recuperando no Plioceno Superior-Pleistoceno (JARAMILLO *et al.*, 2010).

As flutuações climáticas pleistocênicas, famosas por serem o embasamento causal da teoria dos refúgios (HAFFER, 1969; VANZOLINI & WILLIAMS, 1970), provavelmente influenciaram a bacia Amazônica de forma desigual (BEHLING *et al.*,

2010; BUSH *et al.*, 2011). Evidências palinológicas mostram uma predominância do ambiente florestal no oeste amazônico mesmo durante os períodos glaciais, sendo detectadas mudanças na composição de espécies (e.g. espécies de *Podocarpus* que hoje estão restritas aos Andes) e na estrutura da vegetação, com indícios de substituição de uma floresta úmida por uma floresta semidecidual (COLINVAUX *et al.*, 1996; COLINVAUX & DE OLIVEIRA, 2001; BUSH *et al.*, 2004; BEHLING *et al.*, 2010; D'APOLITO *et al.*, 2013). Já o leste amazônico, apresenta fortes evidências de alternância entre o ambiente florestal e savânico, concordante com os período de glaciação (ABSY *et al.*, 1991 *apud* BEHLING *et al.*, 2010; BEHLING, 2002). Dessa forma, as evidências apontam para uma menor precipitação no leste amazônico durante o Pleistoceno (concordando com o padrão climático atual), causando expansão de ambientes savânicos nesta região, e uma maior permanência do ambiente florestal úmido (ainda que com mudanças na composição de espécies) no oeste, mesmo durante os períodos glaciais (BEHLING *et al.*, 2010; MOSBLECH *et al.*, 2012; COHEN *et al.*, 2014).

#### **1.4. Referências Bibliográficas**

Absy, M.L.; Cleef, A.L.; Fournier, M.; Martin, L.; Servant, M. & Sifeddine, A. 1991. Mise en évidence de quatre phases d'ouverture de la forêt dense dans le sud-est de l'Amazonie au cours des 60.000 dernières années. Première comparaison avec d'autres régions tropicales. *CR Acad Sci Paris* 312: 673-678.

Aleixo, A. & Rossetti, D. F. 2007. Avian gene trees, landscape evolution, and geology: towards a modern synthesis of Amazonian historical biogeography? *Journal of Ornithology*, 148: 443-453.

Ayala, S. C. & D. M. Harris. 1982. Una nueva especie de microteido (Sauria: Teiidae) del oriente de Colombia. *Caldasia* 13 (63): 467-472.

Avila-Pires, T.C.S. 1995. Lizards of Brazilian Amazonia (Reptilia: Squamata). *Zoologische Verhandelingen* 299: 1-706.

Behling, H. 2002. Late Quarternary vegetation and climate dynamics in southeastern Amazonia inferred from Lagoa da Confusão in Tocantins State, northern Brazil. *Amazoniana* 17: 27-39.

Behling, H.; Bush, M. & Hooghiemstra, H. 2010. Biotic development of Quaternary Amazonia: a palynological perspective. *In* C. Hoorn & F. P. Wesselingh (Eds.), *Amazonia: landscape and species evolution. A look into the past* (pp. 335–348). Chichester: Wiley–Blackwell.

Boulenger, G.A. 1885. *Catalogue of the Lizards in the British Museum*. Vol. 2. order of the Trustees.

Brito Neves, B.B. 2002. Main stages of the development of the sedimentary basins of South America and their relationship with the tectonics of supercontinents. *Gondwana Research*, 5:175–196.

Bush, M.B.; De Oliveira, P.E.; Colinvaux, P.A.; Miller, M.C. & Moreno, E. 2004. Amazonian paleoecological histories: one hill, three watersheds. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 214: 359-393.

Bush, M.B., Gosling, W.D. & Colinvaux, P.A. 2011. Climate and vegetation change in the lowlands of the Amazon Basin. *In* M.B. Bush, J.R. Flenley & W.D. Gosling (Eds.), *Tropical Rainforest Responses to Climatic Change*. Berlin: Springer-Verlag.

Colinvaux, P.A.; De Oliveira, P.E.; Moreno, J.E.; Miller, M.C. & Bush, M.B. 1996. A long pollen record from lowland Amazonia: forest and cooling in glacial times. *Science* 274: 85-88.

Colinvaux, P.A. & De Oliveira, P.E. 2001. Amazon plant diversity and climate through the Cenozoic. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 166 (1-2): 51-63.

Cope, E.D. 1868. Sixth contribution to the Herpetology of Tropical America. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* 20: 305-313.

Cope, E.D. 1886. Catalogue of the species of Batrachians and Reptiles contained in a collection made at Pebas, Upper Amazon, by John Hauxwell. *Proceedings of the American Philosophical Society* 23 (121): 94-103.

Cohen, M.C.L.; Rossetti, D.F.; Pessenda, L.C.R.; Friaes, Y.S. & Oliveira, P.E. 2014. Late Pleistocene glacial forest of Humaitá-Western Amazonia. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 415: 37-47.

D'Apolito, C.; Absy, M.L. & Latrubesse, E.M. 2013. The Hill of Six Lakes revisited: new data and re-evaluation of a key Pleistocene Amazon site. *Quaternary Science Reviews* 76: 140-155.

Esqueda, L.F. 2005. Un Nuevo *Leposoma* (Squamata, Gymnophthalmidae) de la Reserva Forestal de Caparo, Estado Barinas, Venezuela. *Herpetotropicos* 2(1): 33-42.

Esput, N.; Baby, P.; Brusset, S.; Roddaz, M.; Hermoza, W. & Barbarand, J. 2010. The Nazca Ridge and uplift of the Fitzcarrald Arch: implications for regional geology in northern South America. In C. Hoorn & F. P. Wesselingh (Eds.), Amazonia: landscape and species evolution. A look into the past (pp. 89–102). Chichester: Wiley–Blackwell.

Figueiredo, J.J.P.; Hoorn, C.; van der Vem, P.H. & Soares, E.F. 2009. Late Miocene onset of the Amazon River and the Amazon deep-sea fan: Evidence from the Foz do Amazonas Basin. *Geology* 37: 619–622.

Garzione, C.N.; Hoke, G.D.; Libarkin, J.C.; Withers, S.; MacFadden, B.; Eiler, J.; Ghosh, P. & Mulch, A. 2008. Rise of the Andes. *Science* 320: 1304-1307.

Goicoechea, N.; Padial, J.M.; Chaparro, J.C.; Castroviejo-Fisher, S. & de la Riva, I. 2012. Molecular phylogenetics, species diversity, and biogeography of the Andean lizards of the genus *Proctoporus* (Squamata: Gymnophthalmidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 65: 953-964.

Haffer, J. 1969. Speciation in Amazonian forest birds. *Science* 165: 131-136.

Hoorn, C. 1994. An environmental reconstruction of the palaeo-Amazon River system (Middle-Late Miocene, NW Amazonia). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 109: 1-54.

Hoorn, C. & Wesselingh, F. 2010. Amazonia, Landscape and species evolution: a look into the past. Chichester: Wiley–Blackwell. 464 p.

Hoorn, C.; Guerrero, J.; Sarmiento, G.A. & Lorente, M.A. 1995. Andean tectonics as a cause for drainage patterns in Miocene Northern South America. *Geology* 23, 237–240.

Hoorn, C.; Wesselingh, F.P.; Ter Steege, H.; Bermudez, M.A.; Mora, A.; Sevink, J.; Sanmartín, I.; Sanchez-Meseguer, A.; Anderson, C.L.; Figueiredo, J.P.; Jaramillo, C.; Riff, D.; Negri, F.R.; Hooghiemstra, H.; Lundberg, J.; Stadler, T.; Särkinen, T. & Antonelli, A.

2010a. Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. *Science* 330:927-931.

Hoorn, C.; Roddaz, M.; Dino, R.; Soares, E.; Uba, C. & Ochoa-Lozano, D. 2010b. The Amazonian Craton and its influence on past fluvial systems (Mesozoic–Cenozoic, Amazonia). In C. Hoorn & F. P. Wesselingh (Eds.), Amazonia: landscape and species evolution. A look into the past (pp. 101–122). Chichester: Wiley–Blackwell.

Hoorn, C.; Wesselingh, F.P.; Hovikoski, J. & Guerrero, J. 2010c. The development of the Amazonian mega-wetland (Miocene; Brazil, Colombia, Peru, Bolivia). In C. Hoorn & F. P. Wesselingh (Eds.), Amazonia: landscape and species evolution. A look into the past (pp. 123–142). Chichester: Wiley–Blackwell.

Hovikoski, J.; Wesselingh, F.; Räsänen, M.; Gingras, M. & Vonhof, H. 2010. Marine influence in Amazonia: evidence from the geological record. In C. Hoorn & F. P. Wesselingh (Eds.), Amazonia: landscape and species evolution. A look into the past (pp. 143–161). Chichester: Wiley–Blackwell.

Irion, G., & Kalliola, R. 2010. Long-term landscape development processes in Amazonia. In C. Hoorn & F. P. Wesselingh (Eds.), Amazonia: landscape and species evolution. A look into the past (pp. 185–197). Chichester: Wiley–Blackwell.

Jaramillo, C.; Rueda, M.J. & Mora, G. 2006. Cenozoic plant diversity in the Neotropics. *Science* 311: 1893-1896.

Jaramillo, C.; Hoorn, C.; Silva, S.A.F.; Leite, F.; Herrera, F.; Dino, R. & Antonioli, L. 2010. The origin of the modern Amazon rainforest: implications of the palynological and paleobotanical record. In C. Hoorn & F. P. Wesselingh (Eds.), Amazonia: landscape and species evolution. A look into the past (pp. 317–334). Chichester: Wiley–Blackwell.

Kok, P.J.R. 2008. A new highland species of *Arthrosaura* Boulenger. 1885 (Squamata: Gymnophthalmidae) from Maringma tepui on the border of Guyana and Brazil. *Zootaxa* 1909: 1-15.

Laguna, M.M.; M.T. Rodrigues; R.M.L. Santos; Y. Yonenaga-Yassuda; T.C.S. Avila-Pires; M.S. Hoogmoed & K.C.M. Pellegrino. 2010. Karyotypes of a criptic diploid form of the unisexual *Leposoma percarinatum* (Squamata, Gymnophthalmidae) and the

bisexual *Leposoma ferreirai* from the Lower Rio Negro, Amazonian Brazil. *Journal of Herpetology* 44 (1): 153-157.

MacCulloch, R.D. & Lathrop, A. 2001. A new species of *Arthrosaura* (Sauria: Teiidae) from the highlands of Guyana. *Caribbean Journal of Science* 37(3-4): 174-181.

Mora, A.; Baby, P.; Roddaz, M.; Parra, M.; Brusset, S. & Hermoza, W. 2010. Tectonic history of the Andes and sub-Andean zones: implications for the development of the Amazon drainage basin. In C. Hoorn & F. P. Wesselingh (Eds.), *Amazonia: landscape and species evolution. A look into the past* (pp. 38–60). Chichester: Wiley–Blackwell.

Mosblech, N.A.S.; Bush, M.B.; Gosling, W.D.; Hodell, D.; Thomas, L.; van Calsteren, P.; Correa-Metrio, A.; Valencia, B.G.; Curtis, J. & van Woesik, R. 2012. North Atlantic forcing of Amazonian precipitation during the last ice age. *Nature Geoscience* 5: 817-820.

Müller, L. 1923. Neue oder seltene Reptilien und Batrachier der Zoologischen Sammlung des bayrischen Staates. *Zoologischer Anzeiger* 57 (7/8): 145-156.

Nunes, P.M.S. 2011. Morfologia hemipeniana dos lagartos microteídeos e suas implicações nas relações filogenéticas da família Gymnophthalmidae (Teiioidea: Squamata). Tese (Doutorado) apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Zoologia, São Paulo, Brasil, 137p.

Pellegrino, K.C.M.; M.T. Rodrigues & Y. Yonenaga-Yassuda. 2003. Triploid karyotype of *Leposoma percarinatum* (Squamata, Gymnophthalmidae). *Journal of Herpetology* 37: 197-199.

Pellegrino, K.C.M.; Rodrigues, M.T.; Harris, D.J.; Yonenaga-Yassuda, Y. & Sites Jr., J.W. 2011. Molecular phylogeny, biogeography and insights into the origin of parthenogenesis in the Neotropical genus *Leposoma* (Squamata: Gymnophthalmidae): Ancient links between the Atlantic Forest and Amazonia. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 61: 446-459.

Pons, D. & de Franceschi, D. 2007. Neogene woods from western Peruvian Amazon and palaeoenvironmental interpretation. *Bulletin of Geosciences* 82 (4): 343-354.

Pyron, R.A.; Burbrink, F.T. & Wiens, J.J. 2013. A phylogeny and revised classification of Squamata, including 4161 species of lizards and snakes. *BMC Evolutionary Biology* 13(93): 1-53.

Riff, D.; Romano, S.R.; Oliveira, G.R. & Aguilera, O.A. 2010. Neogene crocodile and turtle fauna in northern South America. *In* C. Hoorn & F. P. Wesselingh (Eds.), *Amazonia: landscape and species evolution. A look into the past* (pp. 259-280). Chichester: Wiley–Blackwell.

Roddaz, M.; Hermoza, W.; Mora, A.; Baby, P.; Parra, M.; Christophoul, F.; Brusset, S. & Espurt, N. 2010. Cenozoic sedimentary evolution of the Amazonian foreland basin system. *In* C. Hoorn & F. P. Wesselingh (Eds.), *Amazonia: landscape and species evolution. A look into the past* (pp. 61–88). Chichester: Wiley–Blackwell.

Rodrigues, M.T. & Avila-Pires, T.C.S. 2005. New lizard of the genus *Leposoma* (Squamata, Gymnophthalmidae) from the Lower Rio Negro, Amazonas, Brazil. *Journal of Herpetology* 39 (4): 541-546.

Ruibal, R. 1952. Revisionary studies of some South American Teiidae. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology* 106 (11): 477-529.

Ruthven, A.G. & H.T. Gaige. 1924. A new *Leposoma* from Panama. *Occasional Papers of the Museum of Zoology, University of Michigan* 147: 1-3.

Sacek, V. 2014. Drainage reversal of the Amazon River due to coupling of surface and lithospheric processes. *Earth and Planetary Science Letters* 401: 301-312.

Souza, S.M.; Rodrigues, M.T. & Cohn-Haft, M. 2013. Are Amazonia rivers biogeographic barriers for lizards? A study on the geographic variation of the Spectacled Lizard *Leposoma osvaldoi* Avila-Pires (Squamata, Gymnophthalmidae). *Journal of Herpetology* 47(3):511-519.

Spix, J.B. 1825. *Animalia Nova sive species novae Lacertarum, quas in itinere per Brasiliam annis MDCCCXVII-MDCCCXX jussu et auspiciis Maximiliani Josephi I. Bavariae regis: 1-26, pis. 1-18.*— Miinchen.

Uzzel, T. & Barry, J.C. 1971. *Leposoma percarinatum*, a unisexual species related to *L. guianense*; and *Leposoma ioanna*, a new species from pacific coastal Colombia (Sauria, Teiidae). *Postilla Peabody Museum Yale University* 154: 0-39.

van der Hammen, T. & Hooghiemstra, H. 2000. Neogene and Quaternary history of vegetation, climate, and plant diversity in Amazonia. *Quaternary Science Reviews* 19: 725-742.

Vanzolini, P.E. & Williams, E.E. 1970. South American anoles: the geographic differentiation and evolution of the *Anolis chrysolepis* species group (Sauria, Iguanidae). *Arquivos de Zoologia* 19 (1-2): 1-124.

Vonhof, H. B.; Wesselingh, F. P. & Ganssen, G. M. 1998. Reconstruction of the Miocene western Amazonian aquatic system using molluscan isotopic signatures. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 141: 85–93.

Wesselingh, F.P. & Ramos, M.F. 2010. Amazonian aquatic invertebrate faunas (Mollusca, Ostracoda) and their development over the past 30 million years. In C. Hoorn & F. P. Wesselingh (Eds.), Amazonia: landscape and species evolution. A look into the past (pp. 302–316). Chichester: Wiley–Blackwell.

Wesselingh, F.P.; Ranzi, A. & Räsänen, M.E. 2006. Miocene freshwater Mollusca from western Brazilian Amazonia. *Scripta Geologica* 133, 419-437

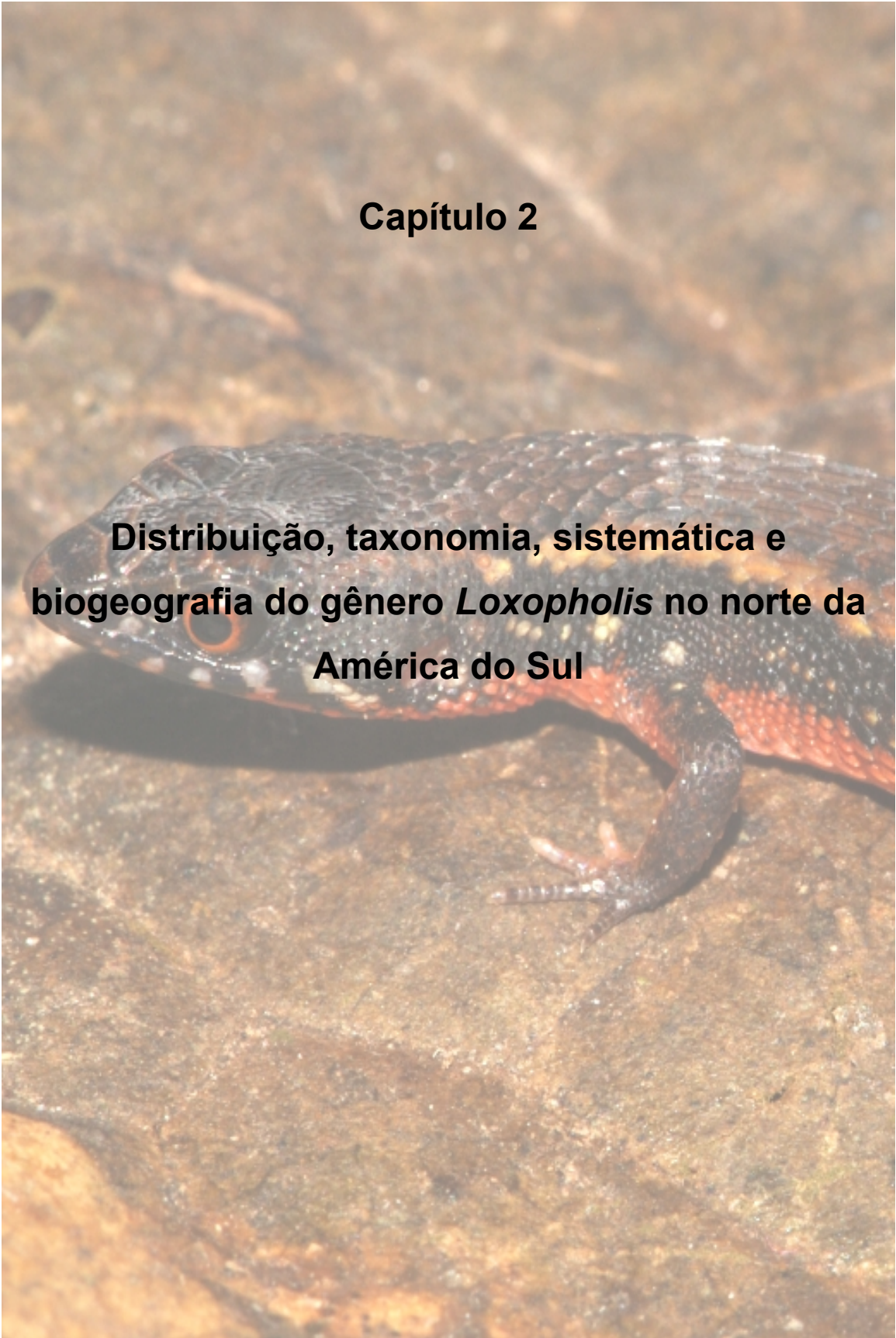
Wesselingh, F. & Hoorn, C.; Kroonenberg, S.B.; Antonelli, A.; Lundberg, J.G.; Vonhof, H.B. & Hooghiemstra, H. 2010. On the origin of Amazonian landscapes and biodiversity: a synthesis. In C. Hoorn & F. P. Wesselingh (Eds.), Amazonia: landscape and species evolution. A look into the past (pp. 421–431). Chichester: Wiley–Blackwell.

Zachos, J.; Pagani, M.; Sloan, L.; Thomas, E. & Billups, K. 2001. Trends, rhythms, and aberrations in global climate 65 Ma to present. *Science* 292: 686-693.



## Capítulo 2

**Distribuição, taxonomia, sistemática e biogeografia do gênero *Loxopholis* no norte da América do Sul**



## Resumo

A Amazônia abriga uma grande parcela da biodiversidade mundial, no entanto, existem grandes incertezas sobre os processos de geração e manutenção dessa enorme diversidade. Diversas hipóteses foram propostas na literatura, abrangendo desde os antigos arcos estruturais, ativos no cráton amazônico antes da formação atual da bacia, até as flutuações climáticas pleistocênicas. Porém, o teste entre diferentes hipóteses exige um detalhado conhecimento sobre taxonomia, distribuição e relações filogenéticas dos grupos biológicos. Neste capítulo, revisamos a variação morfológica e a distribuição geográfica das espécies do gênero *Loxopholis*, assim como estimamos as relações filogenéticas e o tempo de divergência entre as espécies com base em uma análise *multilocus*, que utilizamos como evidência para testar as previsões de diferentes hipóteses sobre a origem da diversidade amazônica. De maneira geral, as nove espécies incluídas na filogenia foram recuperadas como monofiléticas, no entanto, diversas espécies possuem uma grande estruturação intraespecífica (i.e. diversidade críptica). Os tempos de divergência estimados foram antigos, sendo que o início da divergência de *Loxopholis* se deu no Oligoceno. Os tempos de divergência, distribuições geográficas e ecologia das espécies apontam para múltiplos e complexos fatores atuando na história evolutiva de *Loxopholis*, como o soerguimento dos Andes, ativação dos arcos estruturais e formação do lago Pebas. Os rios atuais e as flutuações climáticas pleistocênicas possuíram um papel tardio, provavelmente atuando no estabelecimento de linhagens intraespecíficas em *Loxopholis*.

## Abstract

The Amazon rainforest houses a significant portion of the world biodiversity, however, there is still a lot of uncertainty about the processes involved in its generation and maintenance. Several hypotheses on the impact of landscape features on biodiversity have been proposed for this area, ranging from the influence of ancient structural arches, that were active in the Amazon craton before the formation of the actual basin, to effects of Pleistocene climatic fluctuations. Testing these hypotheses

requires a detailed knowledge about taxonomy, distribution, and phylogenetic relationships of the biota. In this chapter, we revise the morphological variation and geographic distribution of *Loxopholis* lizards. Additionally, we estimated a phylogenetic hypothesis and divergence times for *Loxopholis* species based on a multi-locus dataset. The results were compared with predictions from the different hypotheses about the origins of Amazon biodiversity. The nine species included in the phylogeny were recovered as monophyletic, however, there are several instances of strong intraspecific structure (*i.e.*, cryptic diversity). The estimated divergence times were old, indicating that *Loxopholis* started its diversification during the Oligocene. Divergence times, geographic distributions, and species' ecologies suggested multiple and complex factors affecting *Loxopholis*' evolutionary history, as for example the Andean uplift, the activation of structural arches, and the formation of Pebas Lake. The rivers and the Pleistocene climatic fluctuations might have influenced the establishment of intraspecific lineages in *Loxopholis*.

## **2.1.Introdução**

A Amazônia é reconhecida por abrigar uma das maiores diversidades biológicas do planeta (MITTERMEIER *et al.*, 1999), que está distribuída ao longo de uma área de aproximadamente 8 milhões de Km<sup>2</sup>, englobando uma grande heterogeneidade climática, paisagística e fitofisionômica (SIOLI, 1991; HOORN & WESSELINGH, 2010). Descrições acuradas dos padrões geográficos de organização da diversidade biológica na Amazônia (desde populações até comunidades), assim como o entendimento dos processos responsáveis pela origem e manutenção de tamanha diversidade, possuem implicações imediatas para o manejo e conservação deste Bioma (MORITZ & FAITH, 1998). No entanto, a origem e os padrões geográficos da biodiversidade Amazônica ainda são questões controversas e longe de uma explicação satisfatória. Uma das poucas visões que aparecem como consenso é a de que não existe apenas um fator que pode explicar os atuais níveis da diversidade observados (em oposição a visão de que esta é amplamente atribuída a presença de refúgios florestais pleistocênicos; HAFFER, 1969), e que múltiplos e complexos processos atuaram simultaneamente ou em diferentes épocas (RULL, 2011). Aqui detalhamos alguns dos processos mais

discutidos na literatura biogeográfica da Amazônia (para uma revisão recente, ver LEITE & ROGERS, 2013) com o intuito de testar a correlação entre as previsões de cada hipótese e os resultados esperados para a evolução do gênero *Loxopholis* no norte da América do Sul.

### **2.1.1. Refúgios, rios e arcos tectônicos: diferentes hipóteses de diversificação na Amazônia**

Dentre os processos invocados para explicar o acúmulo e manutenção de diversidade biológica na Amazônia, alguns merecem destaque por sua importância histórica e estímulo no estudo da diversidade deste bioma. Talvez uma das hipóteses que mais influenciou estudos de diversificação em nível de espécies na Amazônia (e no mundo) foi a dos refúgios florestais. Baseada nos ciclos de glaciações experimentados pelo planeta Terra durante o período Pleistoceno (0.011-2.58 milhões de anos (Ma)), ela prediz que, durante as glaciações, o resfriamento do planeta e a menor disponibilidade de umidade causaram a retração de florestas ombrófilas úmidas em “refúgios florestais”, provocada pela expansão de ambientes abertos ou savânicos, isolando os refúgios entre si. Esta barreira ecológica (expansão de áreas abertas) interrompeu o fluxo gênico entre espécies estritamente florestais, favorecendo eventos de especiação e sendo responsável pela grande diversidade de espécies encontrada atualmente nas florestas da América do Sul (HAFFER, 1969; VANZOLINI & WILLIAMS, 1970). Diversos trabalhos filogeográficos, com diversos grupos biológicos, testaram a existência de cenários previstos pelo modelo dos Refúgios, encontrando suportes variáveis para os mesmos (revisado em TURCHETTO-ZOLLET, 2013). A datação de eventos de especiação através de dados moleculares, por exemplo, mostra um amplo intervalo no tempo geológico, indicando que em diversos grupos na América do Sul (e Amazônia), sua origem e diversificação ocorreu antes dos períodos glaciais (e.g. HOORN *et al.*, 2010a; RIBAS *et al.*, 2011; WERNECK *et al.*, 2012). Hoje está claro também que, a partir de evidências palinológicas, a retração florestal não foi tão severa quanto inicialmente proposto pela teoria, principalmente no oeste Amazônico (BEHLING *et al.*, 2010; MOSBLECH *et al.*, 2012).

Os grandes rios Amazônicos também foram invocados como importantes barreiras biogeográficas para a biota, idéia desenvolvida a partir da observação de que rios como o Amazonas e o Madeira delimitam a distribuição de espécies-irmãs em margens opostas (AYRES & CLUTTON-BROCK, 1992; RIBAS, 2011; FERNANDES, 2013). Esse padrão de distribuição foi primeiramente registrado por Wallace (1852) em estudos com primatas na Amazônia. A hipótese dos rios como barreiras segue um exemplo clássico de especiação por alopatria, onde o estabelecimento dos rios na Amazônia criaria barreiras geográficas para o fluxo gênico entre as populações separadas em margens opostas, levando a especiação. (AYRES & CLUTTON-BROCK, 1992). Um dos resultados esperados da teoria de rios como barreiras seria o estabelecimento de linhagens e espécies em um tempo anterior (mais antigo) às flutuações climáticas pleistocênicas (GASCON *et al.*, 2000; ANTONELLI *et al.*, 2010; RIBAS *et al.*, 2011), tendo em vista que a formação atual da Bacia Amazônica antecede estas flutuações. A configuração dos rios da Bacia Amazônica sofreu profundas modificações durante o Neogeno (c.a. 23.0 a 2.0 Ma), em grande parte devido aos repetidos pulsos de orogenia dos Andes Central e Norte durante esse período e flutuações do nível do mar (GARZIONE *et al.*, 2008; WESSELINGH *et al.*, 2010). Ainda, devido a suas enormes dimensões, a Bacia Amazônica abriga tanto rios de origem Andina quanto rios predominantemente intracratônicos, que drenam os antigos escudos cristalinos do Brasil Central e das Guianas (SIOLI, 1991; HOORN *et al.*, 2010b). Rios de origem Andina e intracratônicos possuem histórias geológicas e dinâmicas geomorfológicas completamente distintas, o que potencialmente pode influenciar o papel de um rio como potencial barreira geográfica. Por exemplo, rios de origem Andina que correm sobre a bacia sedimentar Amazônica (e.g. Juruá) possuem uma dinâmica de transporte de meandros entre as diferentes margens, maior que rios que correm em terrenos cristalinos antigos mais consolidados, como por exemplo, o Tapajós (GASCON *et al.*, 2000; MORAES *et al.*, 2016). Sendo assim, uma hipótese que estabeleça uma relação causal entre surgimento dos rios e diversidade biológica deve obrigatoriamente levar em conta as idiosincrasias associadas às diferentes categorias de rios Amazônicos.

Os arcos tectônicos constituem outras barreiras alopátricas propostas como importantes fatores na diversificação biótica Amazônica (LOUGHEED *et al.*, 1999; PATTON *et al.*, 2000; SYMULA *et al.*, 2003). Os chamados arcos tectônicos são terras altas formadas por diferentes processos geológicos, expressas ao longo de vários pontos do cráton Amazônico, que estiveram ativos em momentos distintos ao longo da história geológica (LUNDBERG *et al.*, 1998, WESSELINGH & SALO, 2006; HOORN *et al.*, 2010b; Wesselingh *et al.* 2010; CAPUTO & SOARES, 2016). Como elementos estruturais, os arcos possuíram e possuem grande importância nas delimitações das sub-bacias atuais e pretéritas na Amazônia. Um exemplo é o arco do Purus, que esteve ativo na Amazônia Central até aproximadamente o Mioceno tardio (11.0 Ma – FIGUEIREDO *et al.*, 2009) e delimitava a bacia do Solimões a leste e a Bacia do Amazonas a oeste, antes do estabelecimento transcontinental do Rio Amazonas (HOORN *et al.*, 2010b). Existe uma considerável incerteza quanto ao período temporal que alguns arcos estiveram ativos, como por exemplo, os arcos de Monte Alegre e do Gurupá, no leste da Amazônia Brasileira. Mais especificamente, a delimitação das drenagens leste e oeste do proto-Amazonas mudou do arco de Monte Alegre para o arco do Purus ao longo do Oligoceno, entre aproximadamente 36 e 23 Ma (WESSELINGH *et al.*, 2010). Outros arcos, no entanto, possuem sua origem bem documentada, como o arco Fitzcarrald, que começou a ser soerguido no Plioceno, e até hoje controla a estrutura fluvial do sudoeste Amazônico (ESPURT *et al.*, 2010). Como fatores que influenciaram a diversidade biótica, os arcos supostamente possuíram tanto um papel de barreira alopátrica para espécies (e.g. LOUGHEED *et al.*, 1999; PATTON *et al.*, 2000; SYMULA *et al.*, 2003) como promotores de variação das condições edáficas dos solos, ao expor sedimentos da bacia Amazônica outrora soterrados, e influenciar na diversidade beta da Amazônia (e.g. ZUQUIM *et al.*, 2012; TUOMISTO *et al.*; 2016). No entanto, um entendimento satisfatório da posição geográfica e do tempo em que os arcos estiveram ativos é essencial para a elaboração e teste de hipóteses explícitas do papel destes na diversificação biótica na Amazônia (LEITE & ROGERS, 2013).

### **2.1.2. O gênero *Loxopholis* e sua relação com a evolução da paisagem do norte da América do Sul**

O gênero de lagartos *Loxopholis*, grupo focal deste trabalho, possui diversas características que o fazem se destacar como um modelo para a reconstrução da história dos ambientes e diversificação biológica no norte da América do Sul e América Central. Talvez a principal delas seja a grande fidelidade das espécies com o ambiente florestal. Apesar de um grande esforço histórico de coleta em ambientes savânicos da América do Sul (e.g. AZEVEDO *et al.*, 2016), o gênero nunca foi registrado em áreas abertas, indicando que a distribuição de *Loxopholis* pode funcionar como um *proxy* adequado para rastrear a distribuição de florestas tropicais ao longo do tempo evolutivo. Além disso, o pequeno tamanho corporal e baixa resistência a mudanças nas condições ambientais (obs. pess) indicam que as espécies possuem uma baixa vagilidade, ideal para a retenção de sinais biogeográficos (BOND & STOCKMAN, 2008; ÁLVAREZ-PRESAS *et al.*, 2014). Finalmente, as evidências até o momento indicam que as espécies conhecidas possuem distribuição alopátrica ou parapátrica, que podem refletir a presença de importantes barreiras biogeográficas históricas, hoje inexistentes.

No processo de reconstrução da história evolutiva de determinado grupo de organismos, grandes incertezas estão envolvidas, o que pode limitar consideravelmente e até impedir uma profunda análise dos fatores históricos e ecológicos relacionados. Como retratado acima, uma grande parte das incertezas estão relacionadas ao palco da diversificação biológica: como ocorreram as mudanças geológicas e como esta impactou a paisagem Amazônica ao longo dos anos? Apesar de aqui procurarmos tentativamente retratar um cenário proposto (ver introdução geral), grandes controvérsias ainda são encontradas na literatura geológica da Amazônia. Talvez a mais clássica seja quanto ao tempo de formação do curso atual do rio Amazonas, estimada entre 11-10 Milhões de anos atrás (Ma) por um modelo paleogeográfico (HOORN *et al.*, 1995; FIGUEIREDO *et al.*, 2009) e 6-5 Ma por uma visão concorrente (ROSSETTI *et al.*, 2005; CAMPBELL *et al.*, 2006). Devido à escassez de evidências de origem geológica, é possível que nunca tenhamos um conjunto de hipóteses amplamente aceitas.

No entanto, no contexto biológico, as incertezas estão relacionadas tanto às incertezas taxonômicas (impeditivo linneano) quanto a incertezas sobre a distribuição geográfica (impeditivo wallaceano) dos organismos amazônicos. Ambas são decorrentes das dificuldades envolvidas em coleta de dados na Amazônia, uma vasta região geográfica com extraordinárias dificuldades logísticas envolvidas no trabalho de campo para obtenção de amostras. Este trabalho representa um esforço no intuito de diminuir as incertezas biológicas impeditivas do entendimento da biogeografia amazônica. Um grande esforço de campo e de laboratório (e.g. visitas a coleções zoológicas) foi dispensado na obtenção de dados georreferenciados de distribuição geográfica, assim como a confirmação da identificação taxonômica dos registros de *Loxopholis* a partir de vouchers em museus. Adicionalmente, utilizamos uma abordagem *multilocus* para reconstruir as relações filogenéticas entre as 9 das 11 espécies descritas de *Loxopholis*, assim como para testar o monofiletismo das mesmas e estimar o tempo de divergência entre elas. As estimativas de tempo decorreram de uma análise filogenética mais ampla realizada neste trabalho, onde incluímos, além de Gymnophthalmidae, representantes das famílias Teiidae, Lacertidae e Amphisbaenidae, possibilitando a calibração a partir de informação de fósseis (ver abaixo mais detalhes). Com isso, as evidências levantadas aqui (distribuição, taxonomia, filogenia e tempos de divergência) foram usadas conjuntamente para propor um cenário da evolução da paisagem Amazônica durante o Neogeno.

## **2.2. Materiais e Métodos**

### **2.2.1. Delimitação da distribuição geográfica de *Loxopholis***

Compilamos uma base de dados de distribuição das espécies de *Loxopholis* a partir de dados coletados no campo ao longo de várias expedições realizadas pelos autores (MTR e SMS) e por colegas, dados de museus, da literatura e do banco de dados on-line GBIF ([www.gbif.org](http://www.gbif.org)). No total, nossa base de dados conta com 880 localidades ao longo do norte da América do Sul. Muitos exemplares de museus e do GBIF não possuíam dados georreferenciados. Esse foi o caso para 272 das localidades estudadas. Essas localidades foram georreferenciadas, e a fonte das coordenadas dessas localidades variou segundo a disponibilidade de informações. Em muitos casos,



uma adequada descrição da localidade permitiu o georreferenciamento com relativamente boa precisão no Google Earth (e.g. Surinam: Brokopondo; 65 km airline SSE Paramaribo on Afobaka Rd., ca. 80 m). Em outros casos, a mesma localidade foi amostrada para outros grupos biológicos e trabalhos publicados anteriormente já haviam mencionado e georreferenciado a referida localidade. Nesses casos, citamos a referência do trabalho publicado como fonte da coordenada no banco de dados. Outras coordenadas foram resgatadas a partir de diários de viagens dos coletores. Diversas coordenadas também foram obtidas de documentos baixados da internet, como Planos de Manejo de Unidades de Conservação, listas de aeroportos, etc. Localidades que foram encontradas segundo o banco de dados do Google Earth foram também checadas por outras fontes para testar a coerência das informações sobre a localidade. Em casos extremos, onde nenhuma informação confiável pode ser localizada, desconsideramos o registro.

Os registros de localidades foram divididos em três categorias, de acordo com o grau de confiabilidade do registro em relação à identificação taxonômica. As categorias foram: registros com identificação taxonômica verificada a partir da morfologia, verificada a partir de dados genéticos, e outros, sendo que esta última representa os registros menos confiáveis do ponto de vista taxonômico, sendo provenientes do GBIF e da literatura. No total, 46 registros foram confirmados tanto por dados genéticos quanto morfológicos; 37 apresentam identificação confirmada apenas por dados genéticos; 237 registros foram confirmados apenas por dados morfológicos, e 560 registros foram baseados em dados de GBIF ou literatura (i.e. outros). Os mapas de distribuição por espécie podem ser visualizados nas Figuras 1 a 9.

### **2.2.2. Amostragem morfológica**

Foram verificados exemplares das seguintes coleções zoológicas: American Museum of Natural History, New York, USA (AMNH), Museum of Comparative Zoology, Boston, USA (MCZ), Centro de Ornitologia e Biodiversidad, Lima, Perú (CORBIDI), Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú (UNMSM), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, Brasil (INPA), Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, Pará, Brasil (MPEG) e Museu de Zoologia da Universidade de São

Paulo, São Paulo, Brasil (MZUSP), assim como exemplares não tombados em nenhuma coleção. No âmbito deste trabalho, foi analisada a morfologia de um total de 861 exemplares de *Loxopholis* das espécies *L. caparensis*, *L. guianense*, *L. hexalepis*, *L. osvaldoi*, *L. parietalis*, *L. percarinatum*, *L. rugiceps*, *L. snethlageae* e *L. southi* (Apêndice 4). Foram analisadas 20 variáveis merísticas, 45 variáveis categóricas e 16 variáveis morfométricas para cada exemplar. No entanto, nem todos os indivíduos foram analisados para todos os caracteres, e vários indivíduos possuem dados faltantes em alguma destas variáveis. O número de indivíduos analisados por variável por espécie pode é apresentado nas Tabelas 2 e 3, assim como nas Figuras 1 a 9. A lista dos caracteres analisados, assim como a explicação dos mesmos encontra-se no apêndice 3.

### **2.2.3. Amostragem molecular**

Foram selecionadas 86 amostras para compor a filogenia molecular de *Loxopholis* (Tabela 1). Das 11 espécies nominais do grupo, foram incluídas nessa análise nove espécies, estando ausente *L. ioanna* e *L. caparensis*. A primeira é conhecida por apenas dois indivíduos do Chocó Colombiano, e a única amostra de tecido disponível para a segunda, também endêmica do norte da Colômbia e Venezuela, não foi sequenciada com sucesso. Algumas espécies estão representadas por poucas amostras, visto a dificuldade de se conseguir amostras de tecido, ou por sua distribuição restrita, ou uma combinação destes fatores. São estas *L. hexalepis*, *L. southi*, *L. rugiceps*, *L. parietalis*, e *L. ferreirai*. As espécies *L. osvaldoi* e *L. guianense* são as que possuem maior representação geográfica na análise (Figura 1). Além disso, com o intuito de obter uma boa representação da tribo Ecleopodini (*sensu* PELLEGRINO *et al.*, 2001) e testar o monofiletismo e a posição filogenética de *Loxopholis* dentro da tribo, incluímos ao menos um representante de quase todos os gêneros da tribo (Tabela 1), a saber: *Amapasaurus tetradactylus*, *Anotosaura vanzolinia*, *Arthrosaura guianensis*, *Arthrosaura reticulata*, *Arthrosaura kockii*, *Colobosauroides carvalhoi*, *Dryadosaura nordestina*, *Ecleopus gaudichaudii*, *Kaieterosaurus hindsii* e *Marinusaurus curupira*. Além disso, incluímos também um representante de cada tribo ou subfamília da família Gymnophthalmidae, a saber: *Neusticurus bicarinatus*

(Cercosaurini), *Iphisa elegans* e *Tretioscincus oriximinensis* (Gymnophthalminae). As árvores foram enraizadas com *Alopoglossus angulatus* (Alopoglossidae), tendo em vista a posição basal deste taxon em relação à Gymnophthalmidae (PELLEGRINO *et al.*, 2001; CASTOE *et al.*, 2004; GOICOCHEA *et al.*, 2016). A maioria das sequências utilizadas foi gerada no âmbito deste trabalho. No entanto, para as estimativas das taxas de mutação dos marcadores CYTB e NT3 (ver abaixo), diversas sequências foram obtidas do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), com o intuito de calibrar a árvore com fósseis.

A obtenção de dados moleculares concentrou-se em cinco regiões (marcadores) do genoma de *Loxopholis*, sendo dois marcadores mitocondriais e três nucleares. Do genoma mitocondrial, sequenciamos um fragmento de 400 pares de bases (pb) do gene da subunidade menor do RNA ribossomal 12s (12s) e um fragmento de 415 pb do gene do Citocromo B (CYTB). No genoma nuclear, sequenciamos um fragmento de 647 pb do gene para Neurotrofina-3 (NT3), um fragmento de 617 pb do gene para USF3 (KIAA2018) e um fragmento de 987 pb do gene para RAG1 (RAG1). Os primers utilizados estão listados no apêndice 2. Após a amplificação, os produtos da PCR foram purificados com Exonuclease I e Alkaline Phosphatase (protocolo ExoSAP). O sequenciamento foi realizado utilizando o BigDye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems), seguido de análise no sequenciador ABI Prism 310, 3700 or 3170 Genetic Analyzer Sequencers (Applied Biosystems) no Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQUSP, São Paulo, Brasil). As sequências obtidas foram combinadas e editadas utilizando o software Geneious v6.1.8 (Biomatters Ltd.). Após a edição, todas as sequências foram checadas para contaminação através do algoritmo BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Foram realizados alinhamentos respectivos a cada marcador usando o algoritmo ClustalW, implementado no Geneious, com as configurações padrão fornecidas pelo software. Para genes nucleares, as posições polimórficas de nucleotídeos de indivíduos heterozigotos foram codificados a partir dos códigos IUPAC. Para cada sequência heterozigota, inferimos os haplótipos faseados mais prováveis com o algoritmo Bayesiano PHASE, como implementado no programa DnaSP v5.10.01 (LIBRADO & ROZAS, 2009). Os haplótipos reconstruídos

forma incorporados nas análises filogenéticas. A matriz concatenada para os cinco marcadores foi gerada com o programa SequenceMatrix v1.7.8.

#### **2.2.4. Análises filogenéticas e estimativas de tempo de divergência**

Para estimar as relações filogenéticas entre as amostras, foram utilizados dois principais critérios de otimização: máxima verossimilhança (ML) e máxima probabilidade posterior (inferências Bayesianas). A partir de uma matriz concatenada dos cinco genes foram realizadas as análises de ML no programa RaxML v.8 (STAMATAKIS, 2014). Realizamos três corridas independentes, utilizando o algoritmo de busca -f a, que conduz uma análise rápida de *Bootstrap* e procura pela árvore com melhor valor de ML em uma corrida, para isso utilizando um valor de Bootstrap de -# 1000. O modelo de substituição nucleotídica usado foi -m GTRCAT para todas as partições. A convergência entre as árvores de ML obtidas para as 3 corridas foi verificada visualmente.

As análises de Inferência Bayesiana foram divididas em três categorias: primeiramente foram feitas buscas de árvores apenas com os marcadores mitocondriais concatenados e marcadores nucleares concatenados. Para essas análises, foi utilizado o programa MrBayes v3.2. (RONQUIST *et al.*, 2012). Essas análises foram denominadas ao longo do trabalho como inferências Bayesianas com MrBayes (IBM). Posteriormente, as duas categorias de análises restantes foram rodadas utilizando o programa BEAST v1.8.1. e todos os programas associados (BEAUti, Tracer, LogCombiner, TreeAnnotator, FigTree – DRUMMOND *et al.*, 2012). As primeiras análises com o BEAST foram implementadas com o objetivo de estimar as taxas de substituição nucleotídicas dos marcadores utilizados a partir de informação fóssil, testar o monofiletismo do gênero *Loxopholis* e sua posição na tribo Eupleopodini, assim como estimar os tempos de divergência dos principais eventos de diversificação do clado Lacertoidea *sensu* ZHENG & WIENS (2016). Essas análises são denominadas como inferência Bayesiana com fósseis (IBF). A terceira categoria de análise utilizou as taxas de substituição calculadas para calibrar uma árvore utilizando como *ingroup* apenas amostras de *Loxopholis*. Essa análise é denominada como inferência Bayesiana com taxas (IBT). Em todas as análises Bayesianas, a convergência dos parâmetros foi assessada no programa Tracer v1.6 e apenas valores de *effective sample size* (ESS)

maiores de 200 foram considerados como indicativo de amostragem adequada dos parâmetros. As árvores de Máxima Probabilidade Posterior (MAP) e as probabilidades posteriores dos nós foram calculadas após descartar 25% das árvores iniciais como *burn-in*. O suporte estatístico para cada nó foi considerado significativo para valores de probabilidade posterior (PP) igual ou superior a 0,95.

Para as análises IBM (árvores mitocondriais e nucleares concatenadas), foram determinados os modelos de substituição de nucleotídeos para cada marcador, assim como o melhor esquema de partição, no programa PartitionFinder v1.1.0 (LANFEAR *et al.*, 2012), utilizando o Critério de Informação Akaike (AIC). Duas corridas Bayesianas independentes foram implementadas com quatro cadeias de Markov, começando com uma árvore aleatória. Cada corrida consistiu de 10.000.000 de gerações com árvores sendo amostradas a cada 1.000 gerações.

Para rodar as análises de IBF, foram incorporadas sequências do GenBank de espécies não sequenciadas no âmbito deste trabalho. Devido a disponibilidade de sequências no GenBank, foram implementadas duas análises separadas apenas com os marcadores CYTB e NT3. Para diminuir o tempo computacional, foi utilizado apenas uma parte do banco de dados de sequências para *Loxopholis* nas análises IBF, de forma que este subconjunto representasse satisfatoriamente a diversidade genética do gênero (21 amostras do CYTB e 26 do NT3). O clado Lacertoidea foi considerado com base na topologia de Squamata proposta por REEDER *et al.*, (2015) e ZHENG & WIENS (2016), que contam com o posicionamento de fósseis na árvore, e apresentam a seguinte relação: ((Teiidae, (Alopoglossidae, Gymnophthalmidae)), (Lacertidae, Amphisbaenidae)). Esta topologia básica foi fixada durante a análise. A calibração foi realizada em três pontos da árvore: 1) Na base do clado da família Amphisbaenidae, através do mais antigo membro conhecido desta família, *Hodzhakulia magna* (NESSOV, 1985; VITT & CALDWELL, 2009), que viveu no Cenomaniano, entre 99 a 105 Ma; 2) Na base da família Teiidae, através do mais antigo membro conhecido desta família, *Ptilotodon wilsoni* (NYDAM & CIFELLI, 2002), que viveu entre o Aptiano e Albaniano, no Baixo Cretáceo, a aproximadamente 113 Ma e; 3) A partir do primeiro Tupinambinae registrado, *Lumbrerasaurus scagliai* (BRIZUELA & ALBINO, 2015), que viveu no Eoceno

tardio, entre 38 a 45,5 Ma, indicando que, nesta época, já havia ocorrido a separação entre Tupinambinae e Teiinae (BRIZUELA & ALBINO, 2015). Para a calibração dos referidos nós, foi utilizado *priors* de distribuição lognormais, com valores de offset definidos a partir da idade mínima dos fósseis, e valores de log(Mean) e log(Stdev) iguais a 0,5 e 0,75, respectivamente. Esta configuração estabelece uma idade mínima para o nó, ao mesmo tempo que flexibiliza a estimação de tempos máximos. Para ambas as análises, foi utilizado um modelo de relógio relaxado lognormal, de forma que as taxas de substituição de nucleotídeos são estimadas para cada ramo a partir de uma distribuição lognormal. O *prior* ucl.d.mean foi estimado a partir de uma distribuição uniforme, com valores máximos e mínimos de 0 a 1. A calibração da raiz da árvore (=Lacertoidea) foi realizada através de um *prior* de distribuição normal, com valores de média e desvio padrão igual a 155,62 e 17,11 respectivamente, calculados com base em cinco diferentes estimativas de idade para esse nó disponíveis na literatura (MULCAHY *et al.*, 2012; PYRON & BURBRINK, 2014; ZHENG & WIENS, 2016). Ainda, o Tree Prior utilizado foi *Speciation: Yule Process*, o mais indicado para análises interespecíficas, segundo os autores. Para cada marcador, foram realizadas 2 corridas independentes, cada uma com 50.000.000 gerações, amostradas a cada 1000 gerações. As árvores resultantes das duas corridas (após o *burn-in*) foram combinadas no programa LogCombiner v.1.8.1. e a árvore de Máxima Credibilidade de Clados (MCC) foi gerada no TreeAnnotator v.1.8.1.

A análise IBT foi conduzida incluindo apenas as sequências de *Loxopholis* e utilizando *Alopoglossus* como raiz da árvore, a partir da matriz concatenada dos 5 marcadores utilizados. Nesta análise, foi utilizado um modelo de relógio restrito, onde o *prior clock.rate* foi estimado para todos os marcadores. Porém, para o CYTB e o NT3, foram utilizados *priors* de distribuição normal informativos calculados na análise IBF. A taxa de substituição de nucleotídeos estimada para o CYTB foi de 0,0113 subst./sítio/milhões de anos (1,7E-4 de desvio padrão), implementada em uma distribuição normal. Esse valor é relativamente menor, porém semelhante ao valor obtido em estimativas prévias da taxa de substituição de genes mitocondriais em lagartos (PELLEGRINO *et al.*, 2011; WERNECK *et al.*, 2015). Uma distribuição normal

também foi usada como *prior* para a taxa de substituição do NT3, onde foi estimada uma taxa de  $9,0E-4$  subst./sítio/milhões de anos ( $1,0E-5$  de desvio padrão). Os *priors clock.rate* para os genes 12s, KIAA2018 e RAG1 foram configurados de forma não informativa, com distribuição gamma, de parâmetros (shape = 0.001; scale = 1000). O *Tree Prior* utilizado nesta análise foi o *Speciation: Yule Process*. Foram realizadas 4 corridas independentes de 500.000.000 amostradas a cada 50.000 gerações. No entanto, apenas uma das corridas obteve valor de ESS maior de 200 para os parâmetros amostrados, sendo que a combinação dos dados diminuiu os valores de ESS, especialmente para as árvores de genes. Sendo assim, foi utilizado apenas o resultado de uma corrida nesta análise.

## **2.3. Resultados**

### **2.3.1. Distribuição geográfica**

De modo geral, três padrões de distribuição geográfica podem ser delimitados em *Loxopholis*: espécies que ocorrem ao longo das florestas amazônicas (*L. guianense*, *L. osvaldoi*, *L. snethlageae*, *L. parietalis*, *L. percarinatum* e *L. hexalepis*), espécies transandinas, que ocorrem nas terras baixas da Costa Rica, Panamá e Colômbia, ao longo do Chocó e do vale do Rio Magdalena (*L. ioanna*, *L. southi* e *L. rugiceps*) e *L. caparensis*, que está restrita às florestas das encostas dos Andes Norte. *L. percarinatum* também ocorre ao norte da Venezuela (Departamento Monagas) e em outros pontos nessa região ( F.J.M. Rojas-Runjaic, comunic. pess). Ainda, entre as espécies amazônicas, as espécies bissexuais possuem distribuições relativamente restritas, porém a única espécie partenogenética do gênero, *L. percarinatum*, é amplamente distribuída ao longo da Amazônia, apesar de incertezas ainda quanto ao status taxonômico deste complexo de espécies (PELLEGRINO *et al.*, 2011, Apêndice 1 desta tese).

Alguns registros apresentados neste trabalho são duvidosos, todos estes retirados de banco de dados e não confirmados por evidências morfológicas ou genéticas. É o caso, por exemplo, de vários registros de *L. rugiceps* ocorrendo a leste da cordilheira dos Andes, nas localidades Cerro Rojo-Taraira, Rio Guayabero e San Martín, todas na Amazônia Colombiana, e dos únicos dois registros de *L. southi*

ocorrendo no vale do Rio Magdalena, nas localidades Hidroeletrica San Carlos e Cienaga Barbacoas, ambos os registros na Universidad de Antioquia. Esses registros estão tombados principalmente na Universidad de Antioquia, Instituto de Ciencias Naturales (ICN) e Instituto Humboldt, todos na Colômbia. Outros registros que não foram confirmados, mas são potencialmente interessantes, são os *L. parietalis* da Amazônia Colombiana. Historicamente, *L. snethlageae* era nomeado como *L. parietalis*, de modo que esses registros podem, na verdade, ser de *L. snethlageae*. Neste trabalho, pela primeira vez na literatura a espécie *L. snethlageae* é registrada para o Peru e para a Colômbia.

As espécies que ocorrem na bacia Amazônica estão distribuídas ao longo de um eixo leste-oeste, sendo que *L. guianense* com distribuição mais oriental, seguido por *L. osvaldoi*, *L. snethlageae* e *L. parietalis* com distribuição mais ocidental, delimitada a oeste pela cadeia dos Andes. Estas espécies apresentam distribuições parapátricas, sendo que os contatos são constituídos por populações interdigitadas, ao invés de uma quebra biogeográfica distinta e "linear" (e.g. contato entre *L. osvaldoi* e *L. guianense* e contato entre *L. snethlageae* e *L. parietalis*). No entanto, mesmo em áreas de contato, as espécies não ocorrem em simpatria na mesma localidade, apesar de em alguns casos ocorrerem com bastante proximidade (e.g. FLOTA Faro, AVILA-PIRES *et al.*, 2010). Outra característica interessante detectada neste estudo é a ausência de certas espécies em localidades relativamente bem amostradas. Por exemplo, *L. guianense* nunca foi detectado na região de Belém e em alguns lugares bem amostrados do Pará, como a FLONA Caxiuanã. Parece existir também uma ausência tanto de *L. guianense* quanto de *L. osvaldoi* ao longo da região do rio Xingú e sul do estado do Pará/nordeste do Mato Grosso. No entanto, curiosamente, *L. percarinatum* foi amplamente detectado nestas regiões. Outra região onde *Loxopholis* nunca foi registrado é o sudoeste da floresta Amazônica, na Amazônia central do Peru e no estado brasileiro do Acre, apesar de um grande esforço de coleta ter ocorrido nessa região (e.g. DUELMANN, 2005).

### **2.3.2. Variação morfológica em *Loxopholis***

Em relação a morfometria, a principal diferença entre as espécies de *Loxopholis* se dá em relação ao tamanho corporal. Ambas as PCA's, tanto de machos e fêmeas, o



primeiro eixo, tradicionalmente relacionado com tamanho corporal, explica boa parte da variação morfométrica (68,29% em fêmeas e 72,18% em machos). Nesse contexto, tanto machos quanto fêmeas de *L. parietalis* e *L. rugiceps* apresentam o maior tamanho corporal dentro do gênero, seguido de *L. guianense* e *L. southi*, e as menores espécies são *L. osvaldoi*, *L. snethlageae* e *L. hexalepis*. (Figuras 10 e 11) Apenas uma fêmea de *L. caparensis* foi medida, e aparentemente esta espécie também se agrupa com as menores espécies do gênero. Infelizmente as espécies *L. percarinatum* e *L. ferreirai* não foram medidas. O segundo eixo da PCA morfométrica também apresentou uma variação informativa. Para as fêmeas, o segundo eixo separa as espécies *L. hexalepis* e *L. caparensis* de todas as outras espécies apresentando valores negativos (Figura 10). Valores negativos no segundo eixo estão relacionados com maiores valores de comprimento do tronco (TRK), portanto, fêmeas de *L. hexalepis* e *L. caparensis* apresentam maiores valores de comprimento do tronco, independente do tamanho, do que outras espécies de *Loxopholis*. Machos apresentam uma separação parcial no segundo eixo, relacionado ao comprimento do tronco e ao comprimento dos membros: Fêmur, Tíbia e Húmero. De um lado, *L. guianense*, *L. parietalis* e *L. snethlageae*, apresentam valores maiores de comprimento dos membros e valores menores de comprimento do tronco. De outro lado, *L. osvaldoi*, *L. rugiceps*, e *L. hexalepis* apresentam valores menores de comprimento dos membros e valores maiores de comprimento do tronco (Figura 11). Nos casos dos machos ainda, o terceiro eixo da PCA parece separar todas as espécies analisadas de *L. hexalepis* (Figura 11). Aparentemente, machos de *L. hexalepis* provavelmente possuem um comprimento de cabeça maior, independente do tamanho corporal, que todas as outras espécies. No entanto, apenas um macho desta espécie foi medido, de modo que essa conclusão deve ser assumida com cautela.

As variáveis merísticas apresentam importante papel na separação e diagnose entre as espécies de *Loxopholis* (tabela 2). O primeiro eixo das PCA's realizadas com as variáveis merísticas separa as espécies *L. percarinatum*, *L. percarinatum* de Santa Izabel do Rio Negro (SIRN, ver Apêndice 1) e *L. hexalepis* de *L. guianense*, *L. osvaldoi*, *L. parietalis*, *L. southi*, *L. rugiceps* e *L. snethlageae* com base no número de lamelas do

4º dedo e artelho, número de dorsais, ventrais, sublabiais e gulares, sendo que o primeiro grupo apresenta valores maiores para essas variáveis, tanto para machos quanto para fêmeas. O segundo eixo separa *L. rugiceps* das outras espécies com base no número de supralábias, menor nesta espécie (Figuras 12 e 13).

Diversas variáveis categóricas apresentam uma variação informativa para a diagnose das espécies de *Loxopholis*. As variáveis categóricas mais importantes das 45 medidas foram a forma das dorsais na linha médio-dorsal, comprimento e largura das dorsais, presença de quilhas nas ventrais, ventrais imbricadas ou justapostas, tamanho das escamas loreais, escamas da lateral do pescoço desenvolvidas ou grânulos, presença de estrias na 6ª supralabial, tamanho da escama pós-supralabiais em relação às temporais, posição da comissura da boca, tamanho do 4º escudo gular, presença de quilhas nas escamas entre escudos gulares, presença e forma das escamas entre supraoculares e supraciliares, internasal dividida ou inteira, presença de faixa médio-dorsal e faixa lateral, manchas na escama sinfusal e no 1º escudo gular, e intensidade das manchas nos escudos gulares. A lista dos estados de cada caracter por espécie, assim como o número de exemplares analisados por espécie por variável, pode ser visualizada na Tabela 3.

### **2.3.3. Relações filogenéticas**

Ambas as árvores concatenadas mitocondriais e nucleares (análises IBM-não mostradas) apresentaram suporte moderado para o monofiletismo de *Loxopholis*, assim como para a maioria das espécies, apesar de recuperar as espécies como monofiléticas. Tanto a árvore de Máxima Credibilidade de Clados (MCC-análise IBT) como a árvore de Máxima Verossimilhança (ML) concatenadas para os cinco marcadores apresentaram topologias similares (Figura 15). Todas as nove espécies analisadas foram recuperadas como monofiléticas com alto suporte (*bootstrap*=100, PP=1,0), indicando congruência entre os caracteres morfológicos utilizados na taxonomia alfa, na literatura e nas evidências moleculares, assim como um incremento nos valores de probabilidade posterior quando genes nucleares e mitocondriais são analisados conjuntamente. De forma geral, a maioria das relações entre as espécies

recuperadas na análise IBT e ML possuem alto suporte (Figura 15), com exceções detalhadas abaixo.

O gênero *Loxopholis* foi recuperado monofilético com alto suporte nas duas análises (IBT e ML; PP=1.0; *bootstrap*=92; Fig. 15). As espécies de *Loxopholis* estão divididas em dois clados principais. No primeiro clado estão situadas as espécies com distribuição na porção leste e central da Amazônia, que são *L. guianense*, *L. osvaldoi*, *L. hexalepis*, *L. ferreirai* e *L. percarinatum*. O segundo clado recuperado com bom suporte possui distribuição geográfica mais a oeste, constituído pelas espécies *L. snethlageae* e *L. parietalis*. A maioria dos nós das análises IBT e ML possui alto suporte (PP=1,0; *bootstrap* > 90), sendo que a única exceção é a relação entre *L. rugiceps* e *L. southi*, que possui baixo suporte em ambas as análises (Figura 15). Desse modo, um clado trans-andino não foi recuperado e *L. rugiceps* e *L. southi* formam uma politomia juntamente com os dois clados supracitados na base de *Loxopholis*.

#### **2.3.4. Tempos de divergência**

As análises calibradas com fósseis para o CYTB e para o NT3 estimaram tempos ligeiramente divergentes para o início da diversificação de Gymnophthalmoidea na América do Sul, no entanto, as duas análises indicam que os principais eventos de cladogênese em Gymnophthalmoidea ocorreram ao longo do Cretáceo médio e tardio, após a separação do continente sul-americano da África e antes da extinção dos dinossauros (Figura 14, Tabela 4).

A análise de datação indica que o gênero *Loxopholis* possui uma história antiga no norte da América do Sul, tendo começado a se diversificar no Oligoceno, entre c.a. 22 e 35 Ma seguido de uma origem rápida da diversidade atual do gênero, na fronteira do Oligoceno-Mioceno. Durante o Mioceno superior, a c.a. 20 Ma diversos eventos de cladogênese em nível específico ocorreram em *Loxopholis*, como a especiação de *L. guianense* e *L. osvaldoi*, *L. hexalepis* do clado *L. percarinatum*+*L. ferreirai* e *L. parietalis* e *L. snethlageae*. Durante o Mioceno médio, a cerca de 14 Ma, ocorreu a separação entre *L. ferreirai* e *L. percarinatum*, seguido logo depois do início da estruturação genética em nível intraespecífico para várias espécies, como *L. osvaldoi* (ver Capítulo 3), *L. parietalis*, *L. snethlageae* e *L. rugiceps* e *L. guianense*, que ocorreram ao longo do

Mioceno tardio-Plioceno superior, aproximadamente 12 a 6 Ma (Figura 15, Tabela 5). O Plioceno e o Pleistoceno são apontadas como épocas de intensificação da estruturação genética intraespecífica em diversas espécies de *Loxopholis*.

## **2.4. Discussão**

### **2.4.1. Distribuição das espécies de *Loxopholis***

Um padrão confirmado neste trabalho, que posteriormente já havia sido indicado por estudos pontuais de levantamento de espécies (e.g. VANZOLINI, 1986; ZIMMERMAN & RODRIGUES, 1990; MARTINS, 1991; AVILA-PIRES *et al.*, 2010; MENDES-PINTO & SOUZA, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2014), é que as espécies bissexuais do gênero *Loxopholis* são em grande parte alopátricas, e que a única espécie com ampla distribuição na Amazônia, e que ocorre em simpatria com as outras, é a espécie partenogenética *L. percarinatum*. Ainda, *L. percarinatum* foi amplamente registrada em áreas onde, apesar de um grande esforço histórico de amostragem, outras espécies bissexuais não foram detectadas, como os arredores da cidade de Belém-PA e a FLONA Caxiuanã-PA. Apesar de termos obtido uma ampla amostragem de pontos de distribuição, muito ainda precisa ser entendido sobre os mecanismos de manutenção dos limites de distribuição das espécies. Uma pergunta relevante nesse caso descrito acima é até que ponto a partenogênese promoveu a ocupação de nichos ambientais que não estão disponíveis para as espécies bissexuais em *Loxopholis*, tendo em vista que a partenogênese e a poliploidia são fatores que possibilitam a mudança e potencial expansão de nicho (MAU *et al.*, 2015). Essa questão está sendo investigada a partir do banco de dados de distribuição gerado nesse estudo em um projeto de pós-doutorado da Dra. Tuliana Brunes (FAPESP 2016/03146-4), que irá usar a modelagem de nicho das espécies bissexuais e partenogenéticas para tentar entender e elucidar os mecanismos de surgimento da partenogênese em *Loxopholis*. Em relação aos mecanismos que mantêm a parapatria nas espécies bissexuais, dois fatores ecológicos aparecem como possíveis candidatos: exclusão competitiva interespecífica, restrições ambientais relativas a ocupação de diferentes nichos climáticos, ou ambos (GUTIÉRREZ *et al.*, 2014). Futuros estudos neste quesito preferencialmente deverão estudar a distribuição do nicho realizado e fundamental das

espécies, assim como as interações entre as espécies *in situ* ou a partir de experimentos.

Na Amazônia, as espécies de *Loxopholis* seguem um padrão de distribuição leste-oeste. Esse padrão vêm sendo repetidamente recuperado para répteis amazônicos, sendo primeiramente detectado em análises biogeográficas com dados de distribuição para diversas espécies (AVILA-PIRES, 1995; AVILA-PIRES *et al.*, 2009), assim como para estudos filogeográficos, tendo como alvo *Chatogekko amazonicus* (GEURGAS & RODRIGUES, 2010), *Iphisa elegans* (NUNES *et al.*, 2012), *Copeoglossum nigropunctatum* (MIRALLES & CARRANZA, 2010) e *Gonatodes humeralis* (GAMBLE *et al.*, 2008), este último com apenas dois indivíduos amostrados. No entanto, o limite de distribuição entre as faunas leste e oeste é bem variável entre estes diferentes trabalhos, assim como o tempo de diversificação entre os componentes leste e oeste, variando desde o Oligoceno médio (28 Ma) para *Chatogekko amazonicus* (GEURGAS & RODRIGUES, 2010) até o Mioceno superior para (c.a. 9 Ma) em *Varzea* spp. e *Copeoglossum nigropunctatum* (MIRALLES & CARRANZA, 2010), indicando que diferentes processos históricos podem ter atuado no estabelecimento deste padrão de distribuição para squamatas amazônicos.

Outra característica interessante da distribuição das espécies da Amazônia é que grandes rios como o Solimões-Amazonas e Madeira não parecem delimitar a distribuição das espécies, pelo menos não de forma clara como o observado em primatas e aves (e.g. AYRES & CLUTTON-BROCK, 1992; RIBAS *et al.*, 2011; FERNANDES, 2013). Esse padrão também já havia sido detectado em estudos prévios com lagartos amazônicos, novamente com análises biogeográficas com dados de distribuição (AVILA-PIRES, 1995), assim como com trabalhos filogeográficos (e.g. *Chatogekko amazonicus* - GEURGAS & RODRIGUES, 2010). No entanto, em alguns casos locais, alguns rios parecem delimitar o contato entre as espécies. É o caso, por exemplo, do rio Purus, que aparentemente delimita a distribuição entre *L. osvaldoi* e *L. snethlageae* e do rio Jatapú, que separa a ocorrência entre *L. osvaldoi* e *L. guianense* (OLIVEIRA *et al.*, 2014), apesar dos poucos pontos estudados em ambos os casos. As implicações deste padrão de distribuição para o teste de hipótese da teoria dos rios é

discutido abaixo, juntamente com os dados de tempos de diversificação para as espécies.

A revisão da distribuição das espécies apresentada neste trabalho estende a distribuição geográfica conhecida para algumas espécies de *Loxopholis*. Este é o caso de *L. percarinatum*, expandindo a distribuição para o sudeste Amazônico, ocorrendo no estado do Mato Grosso, sudeste do Pará e norte de Tocantins, quando comparado ao mapa apresentado em AVILA-PIRES (1995). No caso de *L. osvaldoi*, sua distribuição é expandida até o norte do rio Amazonas, chegando até a represa de Balbina (AM) ao norte e até a localidade de Faro (PA) a leste. Esses registros foram identificados em trabalhos posteriores como *L. guianense* (e.g. MARTINS, 1991; AVILA-PIRES, 1995; RODRIGUES & AVILA-PIRES, 2005, LAGUNA *et al.*, 2010), *Leposoma* sp. (VITT *et al.*, 2008) ou ainda *Leposoma* sp.n. (AVILA-PIRES *et al.*, 2010). Outra espécie que aumentou a sua distribuição conhecida foi *L. snethlageae*, nas direções leste (localidade Lago Miuá-AM) e oeste, sendo registrada pela primeira vez no Perú e na Colômbia. Ainda, apresentamos os primeiros registros de *L. snethlageae* ao norte do rio Solimões.

#### **2.4.2. Variação morfológica em *Loxopholis***

Em geral, existe pouca variação morfométrica para as diferentes espécies de *Loxopholis*, mesmo com a profunda divergência filogenética encontrada, demonstrando que a morfologia neste gênero é extremamente conservada. Uma hipótese que parece plausível é de que a estabilidade na morfologia segue a relativa homogeneidade do ambiente florestal úmido de terras baixas onde a maioria das espécies ocorre. Essa expectativa é parcialmente corroborada pela variação morfométrica encontrada em *L. hexalepis* e *L. caparensis*. Estas espécies, ambas distribuídas em zonas de transição entre florestas úmidas e o ambiente savânico dos Llanos (MOLINA *et al.*, 2002; ESQUEDA, 2005; este trabalho), mostraram diferenças morfométricas no tamanho dos membros e no comprimento do tronco (figura 10), possuindo uma leve tendência para a morfologia serpentiforme, com membros proporcionalmente menores e tronco mais comprido que as demais espécies. A evolução da morfologia serpentiforme está intimamente relacionada com características do habitat onde as espécies ocorrem, sendo que ambientes quentes e secos possuem uma tendência para selecionar

morfotipos serpentiformes em lagartos neotropicais (RODRIGUES, 1996; GUERRERO, 2012). De fato, ambas as espécies parecem ser as únicas do gênero que estão restritas a ambientes de transição, o que potencialmente poderia explicar a variação morfométrica encontrada como uma adaptação para ambientes ecotonais. No entanto, o resultado encontrado apresenta apenas uma leve tendência para a morfologia serpentiforme, de forma que, dentro da variação morfológica encontrada em Gymnophthalmidae, essas espécies são claramente categorizadas como lacertiformes, sendo que este resultado deve ser encarado apenas como uma tendência evolutiva.

Em relação às variáveis categóricas, algumas variáveis apontadas por AVILA-PIRES (1995) como importantes na distinção das espécies nominais provaram não ser informativas para as espécies analisadas, como por exemplo o tamanho relativo do contato entre as prefrontais e as frontoparietais, que provou ser um caráter altamente polimórfico em várias espécies (tabelas 2 e 3). Esse resultado pode ser explicado pelo maior número de exemplares analisados neste trabalho. Várias variáveis também apresentaram um grande polimorfismo nas espécies nominais, o que pode refletir variações intraespecíficas com potencial interesse para a taxonomia alfa de *Loxopholis*, dado que várias espécies apresentaram grande estruturação e distâncias genéticas intraespecíficas (ver abaixo).

#### **2.4.3. Relações filogenéticas em *Loxopholis***

As relações filogenéticas recuperadas entre as espécies de *Loxopholis* confirmam expectativas prévias de relações baseadas em semelhança morfológica, porém também trazem alguns resultados inesperados. A topologia recuperada no clado leste foi ((*L. guianense*, *L. osvaldoi*), (*L. hexalepis*, (*L. ferreirai*, *L. percarinatum*))). O principal resultado inesperado deste clado foi *L. osvaldoi* como grupo-irmão de *L. guianense*, tendo em vista que, através de semelhança morfológica externa, *L. osvaldoi* era tido como próximo de *L. snethlageae* e *L. parietalis*, essas três espécies estando em sinonímia até a descrição de *L. osvaldoi* e *L. snethlageae* por AVILA-PIRES (1995). Outro agrupamento previamente proposto por PELLEGRINO e col., 2011 e recuperado nesta análise foi a presença de duas linhagens em *L. percarinatum*, que representam os clones 2N e 3N das linhagens partenogenéticas (figura 15). Apenas um indivíduo da

população bissexual de Santa Isabel do Rio Negro (ver Apêndice 1) foi inserido para obter uma boa representatividade na árvore. Uma análise mais detalhada da filogeografia de *L. percarinatum* está em andamento (Dissertação de mestrado de André Justino-Unifesp, sob a orientação da Dra. Katia Pellegrino), de modo que as relações internas de *L. percarinatum* não serão analisadas profundamente neste trabalho.

Como hipotetizado por RODRIGUES & AVILA-PIRES (2005), *L. ferreirai* é o grupo irmão do complexo *L. percarinatum*, clado que por sua vez é irmão de *L. hexalepis*, posicionado pela primeira vez em uma análise filogenética. Apesar do conhecimento sobre a utilização de microhabitats do gênero *Loxopholis* (assim como para a maioria dos Gymnophthalmidae amazônicos) ser claramente insuficiente, é interessante notar que esse clado abriga todas as espécies de *Loxopholis* que estão ligadas a ambientes aquáticos, algumas sendo endêmicas a florestas periodicamente alagáveis, como é o caso de *L. hexalepis* nos Llanos (MOLINA *et al.*, 2002) e *L. ferreirai* no Arquipélago de Anavilhanas (RODRIGUES & AVILA-PIRES, 2005). Apesar de não ser endêmica a regiões periodicamente alagáveis, *L. percarinatum* é frequentemente encontrada associada a igarapés de terra firme e mesmo a florestas alagáveis nas várzeas e igapós da Amazônia (VITT *et al.*, 2008; SOUZA & RODRIGUES, 2009).

Um padrão interessante demonstrado nas análises filogenéticas apresentadas neste trabalho é a grande estruturação genética e tempos profundos de divergência apresentados por algumas espécies, como *L. osvaldoi* (tratada com mais detalhes no Capítulo 3), *L. snethlageae*, *L. parietalis* e *L. rugiceps*. Esse resultado sugere que as espécies nominais aqui inseridas representem na verdade complexos de espécies, e que abriguem uma grande diversidade críptica (BICKFORD *et al.*, 2007), assim como detalhado para *L. osvaldoi* no Capítulo 3 desta tese. Um indicativo de que a taxonomia alfa em *Loxopholis* está atualmente subestimada é o grande número de variáveis categóricas polimórficas presentes em *Loxopholis* (tabelas 2 e 3), variáveis essas que possuem potencial importância para futuras investigações taxonômicas nesses complexos de espécies. No entanto, comparativamente as espécies supracitadas, *L. guianense* apresentou uma menor estruturação genética e tempos de divergência mais



rasos, resultado que também pode refletir diferenças em processos demográficos atuando nas diferentes regiões da Amazônia.

#### **2.4.4. Um modelo para explicar a história evolutiva de *Loxopholis***

Com as evidências de distribuição, taxonômicas, filogenéticas e de tempos de diversificação levantadas aqui, construímos aqui um modelo mecanístico de como ocorreu a evolução de *Loxopholis* no norte da América do Sul e quais são os fatores que influenciaram este processo. Nosso modelo é baseado fortemente no cenário proposto por HOORN & WESSELINGH (2010) para os grandes eventos geológicos e modificações da paisagem que culminaram na conformação atual de rios e cadeias montanhosas hoje presentes no norte da América do Sul. Infelizmente, nossa reconstrução está de certa forma restrita às espécies cis-andinas, tendo em vista as incertezas no posicionamento filogenético das espécies trans-andinas *L. rugiceps* e *L. southi*. Não obstante, algumas considerações são feitas em relação à estruturação intraespecífica das linhagens detectadas em *L. rugiceps*. É importante ressaltar também que grande parte desta reconstrução permanece especulativa, no entanto, ela possui alguma validade para o desenvolvimento e teste de hipóteses relativa à diversificação biótica amazônica durante o Neogeno.

O gênero *Loxopholis* possui uma antiga história no norte da América do Sul, iniciando sua diversificação durante o Oligoceno. Nesta época, predominava no oeste amazônico um sistema de rios sub-andino, que corria de sul para o norte e desaguava no Caribe venezuelano, que drenava os Andes incipientes a oeste e rios intracratônicos a leste (WESSELINGH *et al.*, 2010). Durante o Oligoceno, ocorreu o primeiro grande evento de cladogênese em *Loxopholis*, separando um componente leste (ancestral de *L. guianense*, *L. osvaldoi*, *L. percarinatum* e demais) de um componente oeste (ancestral de *L. parietalis*, *L. snethlageae* e possivelmente de *L. southi* e *L. rugiceps*). O processo que estimulou essa primeira grande divisão em *Loxopholis* é bem incerto, refletindo nossas incertezas quanto à configuração da paleopaisagem em tempos tão antigos. No entanto, esta divisão pode estar relacionada a eventos climáticos. Evidências paleoclimáticas do Oligoceno indicam que o clima no oeste amazônico nesta época era bem mais sazonal do que o observado hoje, com uma estação seca

prolongada (WESSELINGH *et al.*, 2006; WESSELINGH *et al.*, 2010). Assumindo que o ancestral de *Loxopholis* possui grande fidelidade ao ambiente úmido e sombreado das florestas tropicais como observado hoje, é possível que um aumento de sazonalidade no oeste tenha levado a retração da distribuição e posterior cladogênese dos dois componentes.

Durante a transição do Oligoceno para o Mioceno (c.a. 24 Ma), ocorre a separação do ancestral de *L. guianense* e *L. osvaldoi* do ancestral de *L. percarinatum*, *L. ferreirai* e *L. hexalepis*. Esse evento coincide com o afogamento da bacia de frente de cadeia dos Andes e o início do desenvolvimento do Lago Pebas, nessa fase chamado de sistema proto-Pebas, com extensão ainda restrita ao oeste amazônico, posteriormente se estendendo (Mioceno médio) para o leste e alcançando sua extensão máxima (WESSELINGH *et al.*, 2010). O desenvolvimento de um grande sistema de lagos e pântanos na Amazônia pode ter sido o gatilho para a evolução de uma linhagem de *Loxopholis* adaptada a ambientes aquáticos e periodicamente alagáveis, como é o caso do clado *L. percarinatum* até os dias atuais. Essa adaptação permitiu ao ancestral do clado *L. percarinatum* a colonizar os ambientes alagáveis do oeste amazônico, enquanto que o ancestral de *L. guianense* e *L. osvaldoi* ficou restrito aos escudos das Guianas e do Brasil Central a leste, pouco influenciados pelo desenvolvimento do Lago Pebas a oeste.

Posteriormente, durante o Mioceno inferior (20 Ma) três eventos principais de cladogênese ocorrem em *Loxopholis*. O primeiro é a especiação entre *L. guianense* e *L. osvaldoi*, evento este que provavelmente se deu no leste Amazônico, onde o contato entre as duas espécies ocorre até os dias atuais. As evidências temporais e de distribuição das espécies irmãs apontam o arco de Monte Alegre (situado próximo a cidade homônima no estado do Pará) como uma potencial barreira vicariante, atuando no isolamento de *L. guianense* a leste e *L. osvaldoi* a oeste. O arco de Monte Alegre atuou como divisor entre as bacias do Solimões a oeste (desaguando no sistema proto-Pebas), e a bacia do Amazonas a leste, desaguando no Atlântico. WESSELINGH e col. 2010 argumenta que o papel de divisor hidrográfico desta estrutura passou a ser exercido pelo Arco do Purus (mais a oeste, próximo a cidade de Manaus) em algum

momento durante o Oligoceno (34-24 Ma). Desse modo, existe pouca sobreposição entre o intervalo estimado aqui para a separação de *L. guianense* e *L. osvaldoi* (25,7-16,0 Ma) e o período em que o arco de Monte Alegre esteve ativo como divisor de bacias. No entanto, dada as incertezas associadas as reconstruções geológicas neste período, este cenário aparece como uma possibilidade, sendo que as evidências biológicas levantadas aqui podem ainda contribuir na diminuição destas incertezas.

O segundo evento importante na história evolutiva de *Loxopholis* que ocorreu no Mioceno inferior foi a especiação de *L. parietalis* e *L. snethlageae*, evento esse que ocorreu no oeste amazônico. Novamente, evidências de distribuição das espécies e de tempo apontam um outro arco estrutural como possível candidato de uma barreira biogeográfica que isolou geograficamente o ancestral destas duas espécies, o arco de Iquitos. O arco de Iquitos corresponde a o "forebulge" da bacia de frente de cadeia formada durante o soerguimento dos Andes. O soerguimento do arco de Iquitos se iniciou exatamente no Mioceno inferior (RODDAZ *et al.*, 2005), a mesma data estimada para o surgimento de *L. snethlageae* (a leste do arco de Iquitos) e *L. parietalis* (a oeste). Esse fenômeno modificou significativamente a paisagem do oeste Amazônico durante o Mioceno, por criar uma região de terras altas cercada pelo avanço do Lago Pebas. RODDAZ e col., 2005 apontam que o arco de Iquitos pode ter funcionado como uma ilha para espécies restritas ao ambiente florestal, o que pode ser o caso para *Loxopholis* também. No entanto, ressaltamos aqui o possível papel vicariante das terras altas resultante do soerguimento deste arco. Apesar de ainda estar sendo soerguido, o arco de Iquitos foi soterrado por sedimentos e atravessado pelo Rio Solimões a aproximadamente 6 Ma (RODDAZ *et al.*, 2005).

O terceiro evento de especiação ocorrido durante o Mioceno inferior foi a separação de *L. hexalepis* do clado *L. percarinatum* + *L. ferreirai*. A distribuição de *L. hexalepis* aponta que esse evento ocorreu na atual bacia do Rio Orinoco. Durante o Mioceno inferior, a principal drenagem do Norte da América do Sul ainda corria no sentido sul-norte, caracterizando o sistema proto-Pebas, e abrangendo a atual bacia do Orinoco (WESSELINGH *et al.*, 2010). A separação entre as bacias do Amazonas e Orinoco se deu somente no Mioceno superior (c.a. 8 Ma), com o soerguimento do arco

de Vaupés (WANDERLEY-FILHO *et al.*, 2010) . Desse modo, a especiação de *L. hexalepis* provavelmente não esteve ligada com a separação dessas bacias. Talvez a evolução de *L. hexalepis* esteja ligada a eventos ecológicos. O clima no noroeste da América do Sul durante o Mioceno inferior era bem semelhante ao encontrado hoje em dia nos Llanos (WESSELINGH *et al.*, 2010), porém, os Llanos nessa época são marcados por grandes e contínuos episódios de incursão marinha (BAYONA *et al.*, 2008). Tal ambiente salobro deve ter sido extremamente inóspito e desafiador para espécies de *Loxopholis* com ligação ao ambiente aquático, e não é improvável que grandes extinções locais tenham ocorrido e a distribuição do ancestral desse clado tenha se fragmentado, levando a especiação de *L. hexalepis*. Esse cenário, no entanto, é altamente especulativo.

O próximo evento significativo em *Loxopholis* é a separação de *L. ferreirai* de *L. percarinatum*. Esse evento é particularmente enigmático. *Loxopholis ferreirai*, até onde sabemos, é uma espécie endêmica das ilhas do arquipélago fluvial de Anavilhanas, na porção baixa do Rio Negro, que permanece alguns meses por ano completamente submerso devido as flutuações do nível do Rio Negro. Sua origem remonta ao Mioceno médio (c.a. 15 Ma), época de maior extensão geográfica do Lago Pebas (WESSELINGH *et al.*, 2010). No entanto, a origem do arquipélago de Anavilhanas é muito mais recente, datada do Holoceno (LATRUBESSE & FRANZINELLI, 2005; ALMEIDA-FILHO & MIRANDA, 2007). Uma hipótese para explicar esse anacronismo é a de que *L. ferreirai* pode ter sido mais amplamente distribuído durante o Mioceno, e com a retração do Lago Pebas, essa espécie experimentou também uma considerável retração de sua distribuição em razão da diminuição da disponibilidade de habitat (i.e. ilhas alagáveis). No entanto, a atual distribuição desta espécie muito provavelmente está subestimada, e é provável que futuramente venha a ser registrada em outras localidades, especialmente no Rio Negro. O Rio Negro parece ter sido uma região de especial importância para o clado *L. percarinatum*+*L. ferreirai*, tendo em vista a recente descrição de uma população bissexual desta espécie também no Rio Negro (ver Apêndice 1 para uma discussão das implicações deste achado para o entendimento do surgimento da partenogênese em *L. percarinatum*).

O estabelecimento e diversificação de linhagens intraespecíficas em diversas espécies de *Loxopholis*, que se iniciou em grande parte no Mioceno inferior (figura 15), não será discutido em detalhes aqui, uma vez que nossa amostragem é pequena para a maioria das espécies, limitando o poder de discussão sobre os fatores que atuaram no estabelecimento de padrões filogeográficos. O único caso onde possuímos uma boa amostragem filogeográfica é em *L. osvaldoi*. No capítulo 3, tratamos da diversidade críptica, delimitação de espécies, distribuição e relações de parentesco entre as linhagens de *L. osvaldoi*. Incluímos aqui uma hipótese relativo aos processos biogeográficos que originaram a diversidade críptica em *L. osvaldoi*, ao menos em seu nível mais basal. Foram recuperados três clados principais em *L. osvaldoi*: o Clado 1, com distribuição a nordeste e abrangendo linhagens ao norte e ao sul do Rio Solimões-Amazonas; e os Clados 2 e 3, ambos com distribuição a sudoeste (figura 5-Capítulo 3). O tempo de início da diversificação em *L. osvaldoi* foi estimado entre 14.8 -8.9 Ma na análise IBT (tabela 5) e entre 11.8-7.4 Ma na análise de species tree do capítulo 3 (figura 6-Capítulo 3). Curiosamente, o contato entre a distribuição das linhagens situa-se muito próximo de onde ocorria o arco do Purus, que separava as bacias do Solimões a oeste e do Amazonas a leste durante o Mioceno (HOORN & WESSELINGH, 2010; WESSELINGH *et al.*, 2010; CAPUTO & SOARES, 2016). No entanto, o desenvolvimento do arco do Purus é mais antigo do que a idade estimada para a divergência de *L. osvaldoi*, datando do Mioceno inferior (WESSELINGH *et al.*, 2010). A divergência entre os clados nordeste e sudoeste em *L. osvaldoi* é temporalmente (mas não geograficamente) concordante com o estabelecimento do curso transcontinental do rio Amazonas e incisão do arco do Purus, por volta de 11 Ma (FIGUEIREDO *et al.*, 2009). Durante essa época também, a influência marinha atingiu o oeste Amazônico quase que certamente através do tronco do Amazonas (WESSELINGH *et al.*, 2010), o que novamente deve ter criado um ambiente inóspito para as espécies de *Loxopholis* que habitavam as áreas próximas dos corpos d'água, provavelmente acentuando o papel de barreira dos mesmos. Desse modo, duas hipóteses apresentam-se possíveis para a divergência inicial de *L. osvaldoi*: o arco do Purus como agente vicariante (como indicado por evidências da distribuição) ou ainda a formação inicial do rio Amazonas,

com influência marinha, que certamente acentuou seu papel de barreira (como indicado pelas evidências temporais).

Finalmente, nosos dados permitem ainda tecer breves comentários sobre o *timing* de um importante evento biogeográfico, o soerguimento do Istmo do Panamá, possibilitando a conexão de faunas entre a América do Norte e América do Sul (Great American Biotic Interchange – GABI, Simpson 1980). As evidências filogenéticas, de datação (figura 16) e de distribuição sugerem que a espécie *L. rugiceps* iniciou sua diversificação intraespecífica na Colômbia provavelmente no início do Plioceno, c.a. 6 Ma (Tabela 5). O soerguimento do Istmo do Panamá permitiu com que *L. rugiceps* (e provavelmente também *L. southi*) colonizasse a América Central, extendendo sua distribuição até leste da Costa Rica a partir da linhagem do oeste da Colômbia (Sucre). Essa expansão geográfica ocorreu provavelmente no Plioceno, entre 6,8 e 3,1 Ma, estando de acordo com as mais recentes estimativas sobre o timing de formação do Istmo (O'DEA *et al.*, 2016).

## 2.5. Referências bibliográficas

Almeida-Filho, R. & Miranda, F.P. 2007. Mega capture of the Rio Negro and formation of the Anavilhanas Archipelago, Central Amazônia, Brazil: Evidences in an SRTM digital elevation model. *Remote Sensing of Environment* 110: 387-392.

Álvarez-Presas, M.; Sánchez-Gracia, A.; Carbayo, F.; Rozas, J. & Riutort, M. 2014. Insights into the origin and distribution of biodiversity in the Brazilian Atlantic forest hot spot: a statistical phylogeographic study using a low-dispersal organism. *Heredity* 112:656-665.

Antonelli, A.; Quijada-Mascareñas, A.; Crawford, A.J.; Bates, J.M.; Velazco, P.M. & Wüster, W. 2010. Molecular studies and phylogeography of Amazonian tetrapods and their relation to geological and climatic models. *In* C. Hoorn & F. P. Wesselingh (Eds.), *Amazonia: landscape and species evolution. A look into the past* (pp. 386–404). Chichester: Wiley–Blackwell.

Avila-Pires, T.C.S. 1995. Lizards of Brazilian Amazonia (Reptilia: Squamata). *Zoologische Verhandelingen* 299: 1-706.

Avila-Pires, T.C.S.; Vitt, L.J.; Sartorius, S.S. & Zani, P.A. 2009. Squamata (Reptilia) from four sites in southern Amazonia, with a biogeographic analysis of Amazonian lizards. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi* 4(2): 99-118.

Avila-Pires, T.C.S., M.S. Hoogmoed & W.A. Rocha. 2010. Notes on vertebrates of northern Pará, Brazil: a forgotten part of the Guianan Region, I. Herpetofauna. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais* 5(1):13-112.

Ayres, J.M.C., & T.H. Clutton-Brock. 1992. River boundaries and species range size in Amazonian primates. *American Naturalist* 140:531–537.

Azevedo, J.A.R.; Valdujo, P.H. & Nogueira, C.C. 2016. Biogeography of anurans and squamates in the Cerrado hotspot: coincident endemism patterns in the richest and most impacted savanna on the globe. *Journal of Biogeography*, doi: 10.1111/jbi.12803

Bayona, G., Cortes, M., Jaramillo, C., Ojeda, G., Aristizabal, J.J., Reyes-Harker, A. 2008. An integrated analysis of an orogensedimentary basin pair: Latest Cretaceous-Cenozoic evolution of the linked Eastern Cordillera orogen and the Llanos foreland basin of Colombia. *Geological Society of America Bulletin* 120: 1171–1197.

Behling, H. 2002. Late Quarternary vegetation and climate dynamics in southeastern Amazonia inferred from Lagoa da Confusão in Tocantins State, northern Brazil. *Amazoniana* 17: 27-39.

Bickford, D.; Lohman, D.J.; Sodhi, N.S.; Ng, P.K.; Meier, R.; Winker, K.; Ingram, K.K. & Das, I. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution* 22 (3): 148–155.

Bond, J.E. & Stockman, A.K. 2008. An integrative method for delimiting cohesion species: finding the population-species interface in a group of Californian Trapdoor Spiders with extreme genetic divergence and geographic structuring. *Systematic Biology* 57(4): 628-646.

Brizuela, S. & Albino, A.M. 2015. First Tupinambinae teiid (Squamata, Teiidae) from the Palaeogene of South America. *Historical Biology*, doi: 10.1080/08912963.2014.993629

Campbell Jr, K. E.; Frailey, C. D. & Romero-Pittman, L. 2006. The Pan-Amazonian Ucayali Peneplain, late Neogene sedimentation in Amazonia, and the birth of the modern Amazon River system. *Palaeogeography, Palaeoclimatology and Palaeoecology* 239: 166–219.

Caputo, M.V. & Soares, E.A.A. 2016. Eustatic and tectonic change effects in the reversion of the transcontinental Amazon River drainage system. *Brazilian Journal of Geology* 46(2): 301-328.

Castoe, T.A.; Doan, T.M. & Parkinson, C.L. 2004. Data partitions and complex models in Bayesian analysis: the phylogeny of Gymnophthalmid lizards. *Systematic Biology* 53(3): 448-469.

Drummond, A.J.; Suchard, M.A.; Xie, D. & Rambaut, A. 2012. Bayesian Phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution* 29(8): 1969-1973.

Duellman, W.E. 2005. Cusco Amazónico: The lives of amphibians and reptiles in an Amazonian rainforest. Comstock Pub. Associates, 433 pp.

Esqueda, L.F. 2005. Un Nuevo *Leposoma* (Squamata, Gymnophthalmidae) de la Reserva Forestal de Caparo, Estado Barinas, Venezuela. *Herpetotropicos* 2(1): 33-42.

Espurt, N.; Baby, P.; Brusset, S.; Roddaz, M.; Hermoza, W. & Barbarand, J. 2010. The Nazca Ridge and uplift of the Fitzcarrald Arch: implications for regional geology in northern South America. In C. Hoorn & F. P. Wesselingh (Eds.), Amazonia: landscape and species evolution. A look into the past (pp. 89–102). Chichester: Wiley–Blackwell.

Fernandes, A.M. 2013. Fine-scale endemism of Amazonian birds in a threatened landscape. *Biodiversity and Conservation* 22: 2683-2694.

Figueiredo, J.J.P.; Hoorn, C.; van der Vem, P.H. & Soares, E.F. 2009. Late Miocene onset of the Amazon River and the Amazon deep-sea fan: Evidence from the Foz do Amazonas Basin. *Geology* 37: 619–622.

Gamble, T.; Simons, A.M.; Colli, G.R. & Vitt, L.J. 2008. Tertiary climate change and the diversification of the Amazonian gecko genus *Gonatodes* (Sphaerodactylidae, Squamata). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 46: 269-277.



Gascon, C.; Malcolm, J.R.; Patton, J.L.; da Silva, M.N.F.; Bogart, J.P.; Loughheed, S.C.; Peres, C.A.; Neckel, S. & Boag, P.T. 2000. Riverine barriers and the geographic distribution of Amazonian species. *Proceedings of National Academic of Sciences*, 97(25): 13672-13677.

Garzione, C.N.; Hoke, G.D.; Libarkin, J.C.; Withers, S.; MacFadden, B.; Eiler, J.; Ghosh, P. & Mulch, A. 2008. Rise of the Andes. *Science* 320: 1304-1307.

Geurgas, S.R. & Rodrigues, M.T. 2010. The hidden diversity of *Coleodactylus amazonicus* (Sphaerodactylinae, Gekkota) revealed by molecular data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54: 583-593.

Guerrero, A. C. 2012. Evolução da fossorialidade nos lagartos da tribo Gymnophthalmini (Gymnophthalmidae, Squamata). Tese (Doutorado em Zoologia) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012. doi:10.11606/T.41.2012.tde-28082013-095209.

Goicoechea, N.; Padial, J.M.; Chaparro, J.C.; Castroviejo-Fisher, S. & de la Riva, I. 2012. Molecular phylogenetics, species diversity, and biogeography of the Andean lizards of the genus *Proctoporus* (Squamata: Gymnophthalmidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 65: 953-964.

Gutiérrez, E.E.; Boria, R.A. & Anderson, R.P. 2014. Can biotic interactions cause allopatry? Niche models, competition, and distributions of South American mouse opossums. *Ecography* 37: 741-753

Haffer, J. 1969. Speciation in Amazonian forest birds. *Science* 165: 131-136.

Horn, C. & Wesselingh, F. 2010. Amazonia, Landscape and species evolution: a look into the past. Chichester: Wiley–Blackwell. 464 p.

Horn, C.; Guerrero, J.; Sarmiento, G.A. & Lorente, M.A. 1995. Andean tectonics as a cause for drainage patterns in Miocene Northern South America. *Geology* 23, 237–240.

Horn, C.; Wesselingh, F.P.; Ter Steege, H.; Bermudez, M.A.; Mora, A.; Sevink, J.; Sanmartín, I.; Sanchez-Meseguer, A.; Anderson, C.L.; Figueiredo, J.P.; Jaramillo, C.; Riff, D.; Negri, F.R.; Hooghiemstra, H.; Lundberg, J.; Stadler, T.; Särkinen, T. & Antonelli, A.

2010. Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. *Science* 330:927-931.

Hoorn, C.; Roddaz, M.; Dino, R.; Soares, E.; Uba, C. & Ochoa-Lozano, D. 2010b. The Amazonian Craton and its influence on past fluvial systems (Mesozoic–Cenozoic, Amazonia). In C. Hoorn & F. P. Wesselingh (Eds.), *Amazonia: landscape and species evolution. A look into the past* (pp. 101–122). Chichester: Wiley–Blackwell.

Hoorn, C. & Wesselingh, F. 2010. *Amazonia, Landscape and species evolution: a look into the past*. Chichester: Wiley–Blackwell. 464 p.

Laguna, M.M.; M.T. Rodrigues; R.M.L. Santos; Y. Yonenaga-Yassuda; T.C.S. Avila-Pires; M.S. Hoogmoed & K.C.M. Pellegrino. 2010. Karyotypes of a criptic diploid form of the unisexual *Leposoma percarinatum* (Squamata, Gymnophthalmidae) and the bisexual *Leposoma ferreirai* from the Lower Rio Negro, Amazonian Brazil. *Journal of Herpetology* 44 (1): 153-157.

Lanfear, R.; Calcott, B.; Ho, S.Y.W. & Guindon, S. 2012. PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution* 29: 1695–1701. doi:10.1093/molbev/mss020. PubMed: 22319168.

Latrubesse, E.M. & Franzinelli, E. 2005. The late Quarternary evolution of the Negro River, Amazon, Brazil: Implications for island and floodplain formation in large anabranching tropical systems. *Geomorphology* 70: 372-397.

Leite, R.N. & Rogers, D.S. 2013. Revisiting Amazonian phylogeography: insights into diversification hypotheses and novel perspectives. *Organisms Diversity & Evolution*, 13: 639-664.

Librado, P. & Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25:1451-1452.

Lougheed, S. C.; Gascon, C.; Jones, D. A.; Bogart, J. P. & Boag, P. T. 1999. Ridges and rivers: a test of competing hypotheses of Amazonian diversification using a dart-poison frog (*Epipedobates femoralis*). *Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences* 266: 1829–1835.

Lundberg, J.G.; Marshall, L.G.; Guerrero, J.; Horton, B.; Malabarba, M.C.S.L. & Wesselingh, F. 1998. The stage for neotropical fish diversification: a history of South American rivers. *In* M.C.S.L. Malabarba, R.E. Reis, R.P. Vari, Z.M. Lucena, C.A.S. Lucena (Eds.), *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes* (pp. 13-48). Porto Alegre, Brazil: Edipucrs

Martins, M. 1991. The lizards of Balbina, Central Amazonia, Brazil: a qualitative analysis of resource utilization. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 26:179-190.

Mau, M.; Lovell, J.T.; Corral, J.M.; Kiefer, C.; Koch, M.A.; Aliyu, O.M.; & Sharbel, T.F. 2015. Hybrid apomicts trapped in the ecological niches of their sexual ancestors. *Proceedings of National Academy of Sciences* 112(18): doi: 10.1073/pnas.1423447112

Mendes-Pinto, T. J. & Souza, S.M. 2011. Preliminary assessment of amphibians and reptiles from Floresta Nacional do Trairão, with a new snake record for the Pará state, Brazilian Amazon. *Salamandra* 47(4): 199-206.

Mirrales, A. & Carranza, S. 2010. Systematics and biogeography of the Neotropical genus *Mabuya*, with special emphasis on the Amazonian skink *Mabuya nigropunctata* (Reptilia, Scincidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54: 857-869.

Mittermeier, R.A., Myers, N. Mittermeier & C.G. Robles-Gil, P. 1999. Hotspots: Earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. CEMEX.

Molina, C.; Celsa-Señaris, J. & Ayarzagüena, J. 2002. Contribution to the knowledge of the taxonomy, distribution, and natural history of *Leposoma hexalepis* (Reptilia: Gymnophthalmidae) in Venezuela. *Herpetologica* 58(4): 485-491.

Moraes, L.J.C.L.; Pavan, D.; Barros, M.C. & Ribas, C.C. 2016. The combined influence of riverine barriers and flooding gradients on biogeographical patterns for amphibians and squamates in south-eastern Amazonia. *Journal of Biogeography*. doi: 10.1111/jbi.12756.

Moritz, C. & Faith, D. 1998. Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. *Molecular Ecology* 7: 419-429.

Mosblech, N.A.S.; Bush, M.B.; Gosling, W.D.; Hodell, D.; Thomas, L.; van Calsteren, P.; Correa-Metrio, A.; Valencia, B.G.; Curtis, J. & van Woesik, R. 2012. North

Atlantic forcing of Amazonian precipitation during the last ice age. *Nature Geoscience* 5: 817-820.

Mulcahy, D.G.; Noonan, B.P.; Moss, T.; Townsend, T.M.; Reeder, T.W.; Sites, J.W. & Wiens, J.J. 2012. Estimating divergence dates and evaluating dating methods using phylogenomic and mitochondrial data in squamate reptiles. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 65: 974-991.

Nessov. 1985. Redkie kostnye ryby, nazemiye yashcheritsy i mlekopitayushchie zony limanov i primorskikh nizmennostey mela Kyzylkumov [Rare bony fishes, terrestrial lizards, and mammals in the estuarine and coastal lowland zone of the Kyzyl-Kum Cretaceous]. *Yearbook of the All-Union Paleontological Association* 28:199-219.

Nunes, P.M.S.; Fouquet, A.; Curcio, F.; Kok, P.J.R. & Rodrigues, M.T. 2012. Cryptic species in *Iphisa elegans* Gray, 1851 (Squamata: Gymnophthalmidae) revealed by hemipenial morphology and molecular data. *Zoological Journal of Linnean Society* 166: 361-376.

Nydam, R.L. & Cifelli, R.L. 2002. Lizards from the Lower Cretaceous (Aptian-Albian) Antlers and Cloverly formations. *Journal of Vertebrate Paleontology* 22(2): 286-298.

O'Dea, A.; Lessios, H.A.; Coates, A.G. *et al.* 2016. Formation of the Isthmus of Panama. *Science Advances* doi: 10.1126/sciadv.1600883.

Oliveira, D.P.; Souza, S.M.; Frazão, L.; Almeida, A.P. & Hrbek, T. 2014. Lizards from central Jatapú River, Amazonas, Brazil. *CheckList* 10(1): 46-53.

Patton, J. L.; da Silva, M. N. F. & Malcolm, J. R. 2000. Mammals of the Rio Juruá and the evolutionary and ecological diversification of Amazonia. *Bulletin of the American Museum of Natural History*: 1–306.

Pellegrino, K.C.M.; M.T. Rodrigues; Y. Yonenaga-Yassuda & J.W. Sites Jr. 2001. A molecular perspective on the evolution of microteiid lizards (Squamata, Gymnophthalmidae), and a new classification for the family. *Biological Journal of Linnean Society* 74: 315-338.

Pellegrino, K.C.M.; Rodrigues, M.T.; Harris, D.J.; Yonenaga-Yassuda, Y. & Sites Jr., J.W. 2011. Molecular phylogeny, biogeography and insights into the origin of

parthenogenesis in the Neotropical genus *Leposoma* (Squamata: Gymnophthalmidae): Ancient links between the Atlantic Forest and Amazonia. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 61: 446-459.

Pyron, R.A. & Burbrink, F.T. 2014. Early origin of viviparity and multiple reversions to oviparity in squamate reptiles. *Ecology Letters* 17(1): 13-21.

Reeder, T.W.; Townsend, T.M.; Mulcahy, D.G.; Noonan, B.P.; Wood Jr., P.L.; Sites-Jr., J.W. & Wiens, J.J. 2015. Integrated analyses resolve conflicts over squamate reptile phylogeny and reveal unexpected placements for fossil taxa. *PLoS ONE* 10(3): e0118199. doi:10.1371/journal.pone.0118199.

Ribas, C.C.; Aleixo, A.; Nogueira, A.C.R.; Miyaki, C.Y. & Cracraft, J. 2011. A palaeobiogeographic model for biotic diversification within Amazonia over the past three million years. *Proceedings of the Royal Society B - Biological Sciences* doi:10.1098/rspb.2011.1120.

Roddaz, M.; Baby, P.; Brusset, S.; Hermoza, W. & Darrozes, J.M. 2005. Forebulge dynamics and environmental control in Western Amazonia: The case study of the Arch of Iquitos (Peru). *Tectonophysics* 399: 87-108.

Rodrigues, M.T. 1996. Lizards, snakes, and amphisbaenians from the Quarternary sand dunes of the middle Rio São Francisco, Bahia, Brazil. *Journal of Herpetology* 30(4): 513-523.

Rodrigues, M.T. & Avila-Pires, T.C.S. 2005. New lizard of the genus *Leposoma* (Squamata, Gymnophthalmidae) from the Lower Rio Negro, Amazonas, Brazil. *Journal of Herpetology* 39 (4): 541-546.

Ronquist, F.; Teslenko, M.; van der Mark, P.; Ayres, D.L. Darling, A. Höhna, S.; Larget, B.; Liu, L.; Suchard, M. & Huelsenbeck, J.P. 2012. MrBayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 6(3): 539-542.

Rosseti, D.F.; Toledo, P.M. & Góes, A.M. 2005. New geological framework for Western Amazonia (Brazil) and implications for biogeography and evolution. *Quaternary Research* 63: 78-89.

Rull, V. 2011. Neotropical biodiversity: timing and potential drivers. *Trends in Ecology and Evolution*, 26(10): 508-513.

Stamatakis, A. 2014. RaxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30(9): 1312-1313.

Simpson, G.G. 1980. Splendid Isolation: The Curious History of South American Mammals. New Haven: Yale University Press. ISBN 0-300-02434-7.

Sioli, H. 1991. Amazonia: fundamentos da ecologia da maior região de florestas tropicais. Vozes: Petrópolis. 72 p.

Souza, S.M. & Rodrigues, M.T. 2009. *Leposoma percarinatum* (NCN). Aquatic habitat use. *Herpetological Review*, 40(2): 322.

Stamatakis, A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30(9): 1312-1313

Symula, R.; Schulte, R. & Summers, K. 2003. Molecular systematics and phylogeography of Amazonian poison frogs of the genus *Dendrobates*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 26: 452-475.

Tuomisto, H.; Moulatlet, G.M.; Balslev, H.; Emilio, T.; Figueiredo, F.O.G.; Pedersen, D. & Ruokolainen, K. 2016. A compositional turnover zone of biogeographical magnitude within lowland Amazonia. *Journal of Biogeography*. doi: 10.1111/jbi.12864

Turchetto-Zolet, A.C.; Pinheiro, F.; Salgueiro, F.; Palma-Silva, C. 2012. Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Molecular Ecology*, 22(5): 1193-1213.

Vanzolini, P.E. 1986. Levantamento Herpetológico da Área do Estado de Rondônia Sob a Influência da Rodovia BR 364. CNPq Assessoria Editorial, Brasília, Brasil.

Vanzolini, P.E. & Williams, E.E. 1970. South American anoles: the geographic differentiation and evolution of the *Anolis chrysolepis* species group (Sauria, Iguanidae). *Arquivos de Zoologia* 19 (1-2): 1-124.

Vitt, L.J.; Magnusson, W.E. ; Avila-Pires, T.C.S. & Lima, A.P. 2008. Guide to the lizards of Reserva Florestal Adolpho Ducke, Central Amazonia. Manaus: Attema Design Editorial, 176p.

Vitt, L. J., & Caldwell, J.P. 2009. *Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles*. Third Edition. Burlington, Massachusetts, U.S.A.: Academic Press.

Wanderley-Filho, J.R.; Eiras, J.F.; Cunha, P.R.C. & van der Ven, H. 2010. The paleozoic Solimões and Amazonas basins and the Acre foreland basin of Brazil. *In* C. Hoorn & F. P. Wesselingh (Eds.), *Amazonia: landscape and species evolution. A look into the past* (pp. 29–37). Chichester: Wiley–Blackwell.

Werneck, F.P.; Gamble, T.; Colli, G.R.; Rodrigues, M.T. & Sites, J.W. 2012. Deep diversification and long-term persistence in the south american 'dry diagonal': integrating continent-wide phylogeography and distribution modeling of geckos. *Evolution*, 66(10): 3014-3034.

Werneck, F.P.; Leite, R.N.; Geurgas, S.R. & Rodrigues, M.T. 2015. Biogeographic history and cryptic diversity of saxicolous Tropicuridae lizards endemic to the semiarid Caatinga. *BMC Evolutionary Biology* 15:94 doi 10.1186/s12862-015-0368-3

Wesselingh, F. & Salo, J. A. 2006. A Miocene perspective on the evolution of the Amazonian biota. *Scripta Geologica*, 133, 439–458.

Wesselingh, F.P., Guerrero, J., Räsänen, M.E., Romero Pitmann, L., Vonhof, H.B. 2006. Landscape evolution and depositional processes in the Miocene Pebas lake/wetland system: evidence from exploratory boreholes in northeastern Peru. *Scripta Geologica* 133:323–361.

Wesselingh, F. & Hoorn, C.; Kroonenberg, S.B.; Antonelli, A.; Lundberg, J.G.; Vonhof, H.B. & Hooghiemstra, H. 2010. On the origin of Amazonian landscapes and biodiversity: a synthesis. *In* C. Hoorn & F. P. Wesselingh (Eds.), *Amazonia: landscape and species evolution. A look into the past* (pp. 421–431). Chichester: Wiley–Blackwell.

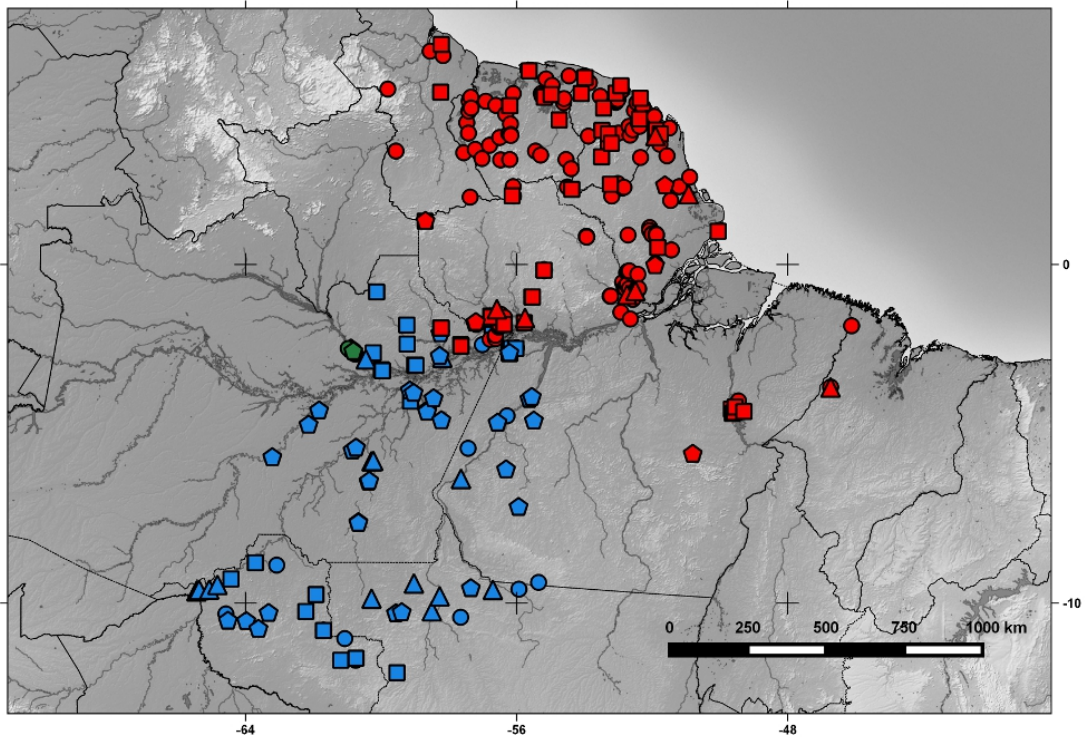
Zheng, Y. & Wiens, J.J. 2016. Combining phylogenomic and supermatrix approaches, and a time-calibrated phylogeny for squamate reptiles (lizards and snakes) based on 52 genes and 4162 species. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 94: 537-547.

Zimmerman, B.L. and M.T. Rodrigues. 1990. Frogs, Snakes, and Lizards of the INPA–WWF Reserves Near Manaus, Brazil. *In* A.H. Gentry (Ed.), *Four Neotropical Rainforests* (pp. 426-454). Yale University Press, New Haven.

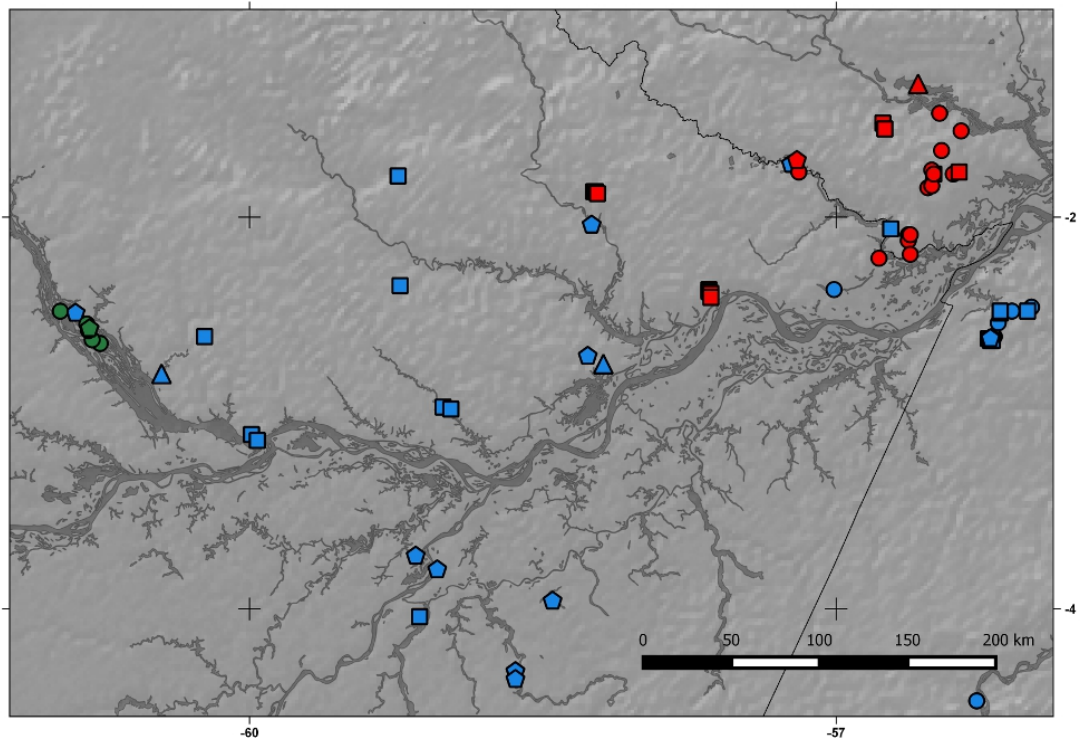
Zuquim, G.; Tuomisto, H.; Costa, F.R.C.; Prado, J.; Magnusson, W.E.; Pimentel, T.; Braga-Neto, R. & Figueiredo, F. 2012. Broad scale distribution of ferns and lycophytes along environmental gradients in Central and Northern Amazonia, Brazil. *Biotropica* 44(6): 752-762.



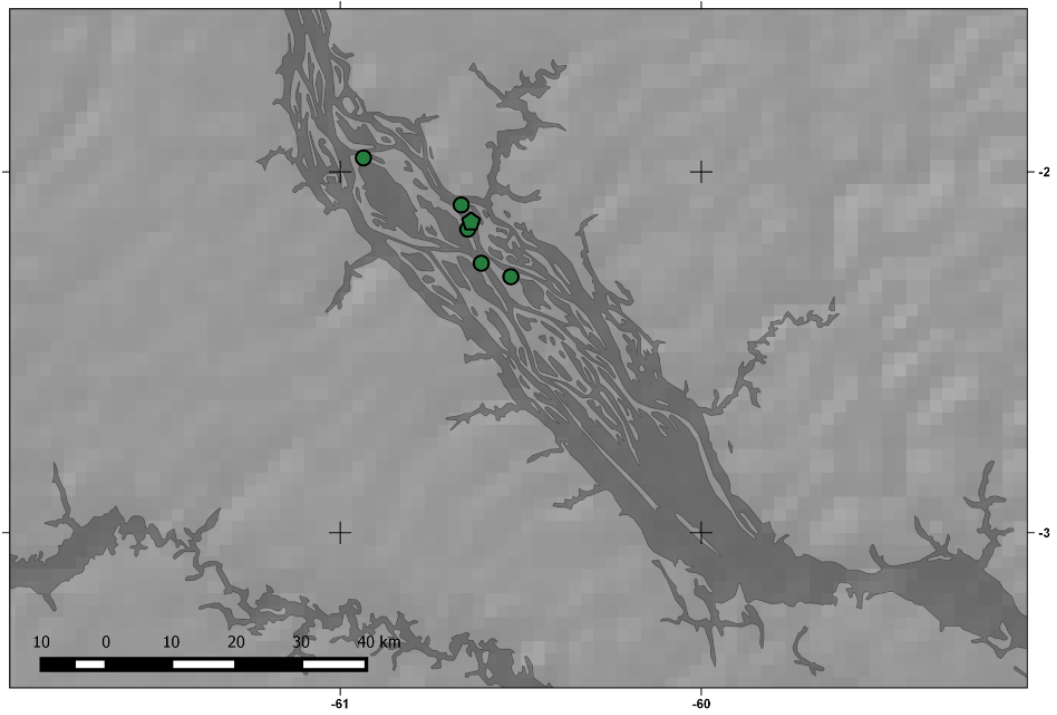
## 2.6. Figuras



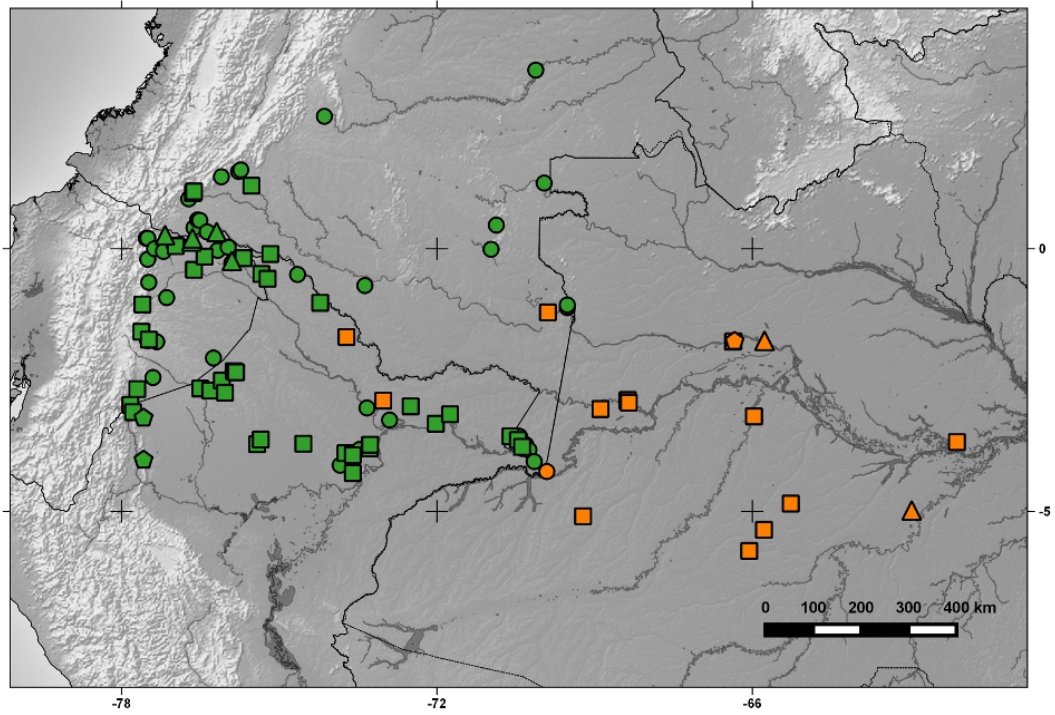
**Figura 1.** Distribuição de *Loxopholis osvaldoi* (azul), *Loxopholis guianense* (vermelho) e *Loxopholis ferreirai* (verde). Diamantes: pontos com dados sobre morfologia e genética; triângulos: só genética; quadrados: só morfologia; círculos: outros registros (literatura e GBIF).



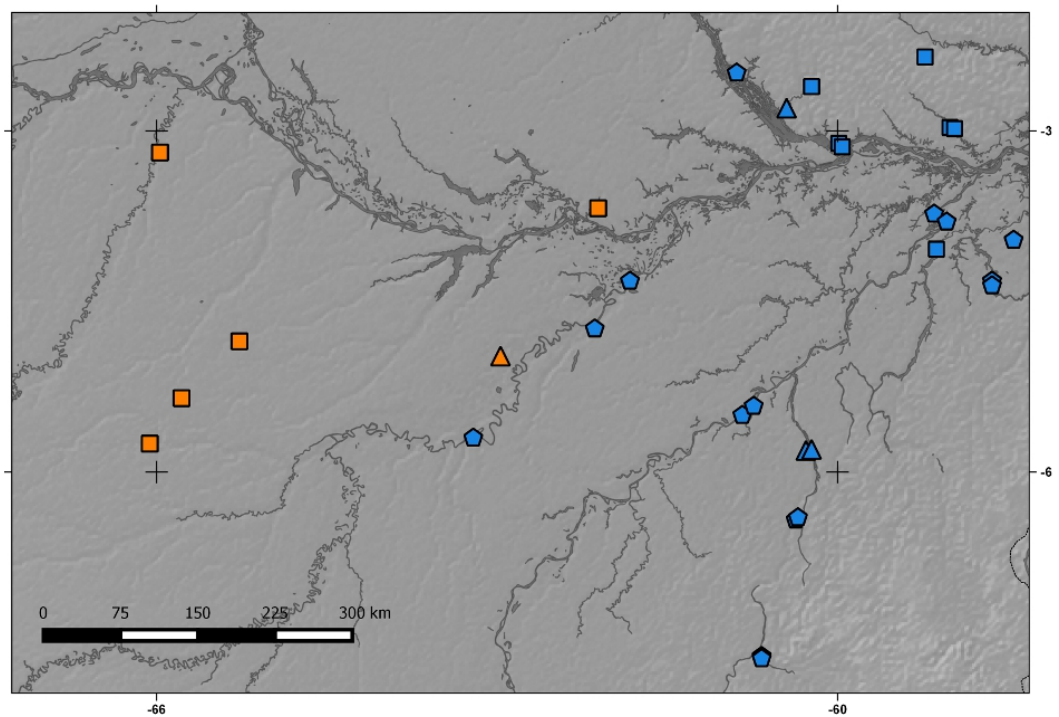
**Figura 2.** Detalhe do contato da distribuição de *Loxopholis osvaldoi* (azul), *Loxopholis guianense* (vermelho) e *Loxopholis ferreirai* (verde) na região próxima a Manaus. Diamantes: pontos com dados sobre morfologia e genética; triangulos: só genética; quadrados: só morfologia; círculos: outros registros (literatura e GBIF).



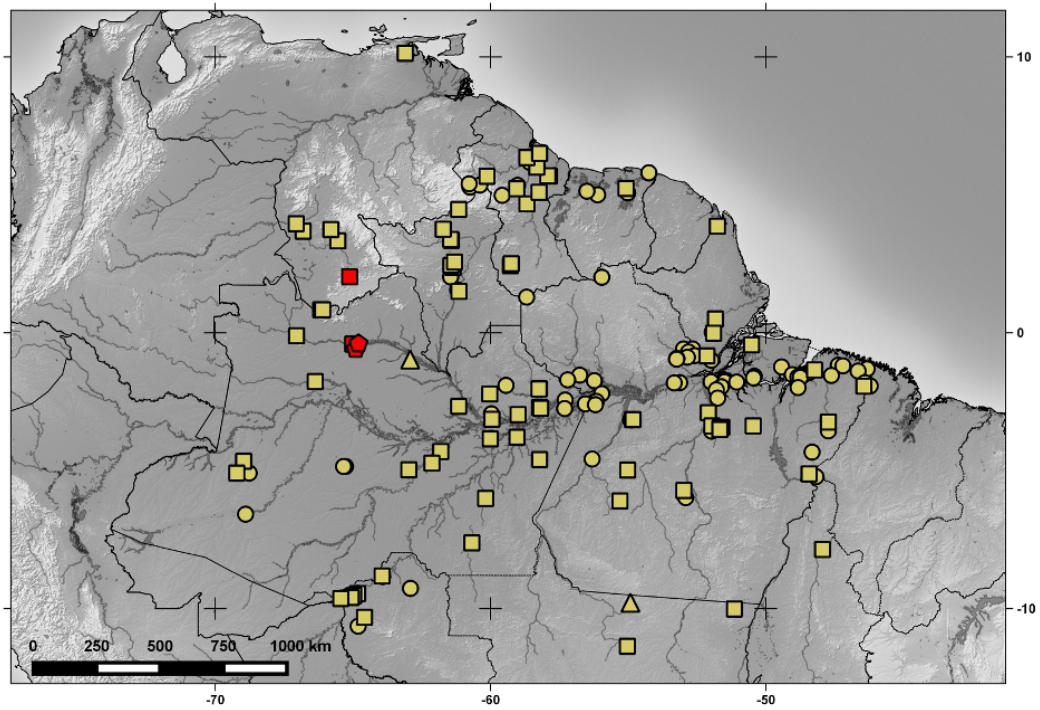
**Figura 3.** Distribuição de *Loxopholis ferreirai* (verde) no Arquipélago de Anavilhanas, AM. Diamantes: pontos com dados sobre morfologia e genética; círculos: outros registros (Caderno de campo MTR).



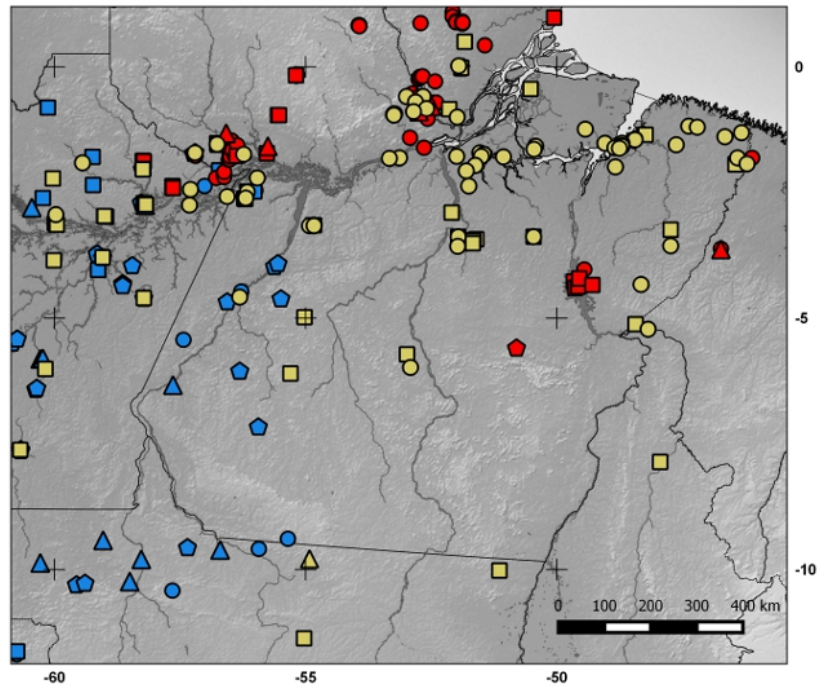
**Figura 4.** Distribuição de *Loxopholis snethlageae* (laranja) e *Loxopholis parietalis* (verde). Diamantes: pontos com dados sobre morfologia e genética; triângulos: só genética; quadrados: só morfologia; círculos: outros registros (literatura e GBIF).



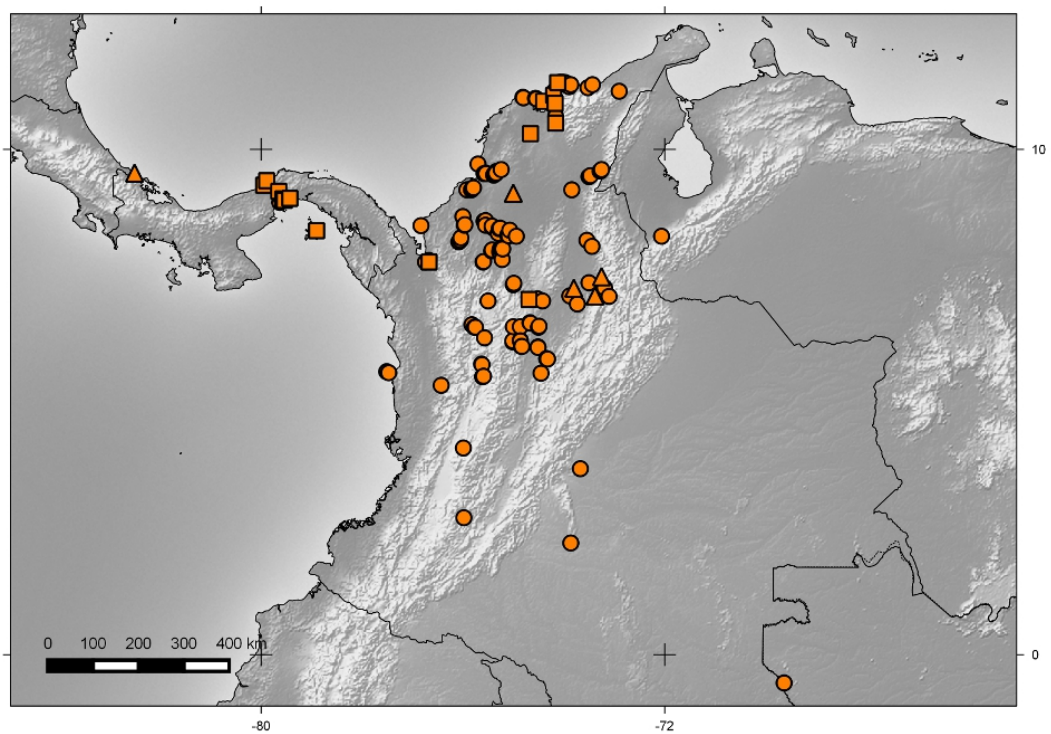
**Figura 5.** Detalhe do contato entre as distribuições de *Loxopholis snethlageae* (laranja) e *Loxopholis osvaldoi* (azul). Diamantes: pontos com dados sobre morfologia e genética; triangulos: só genética; quadrados: só morfologia; círculos: outros registros (literatura e GBIF).



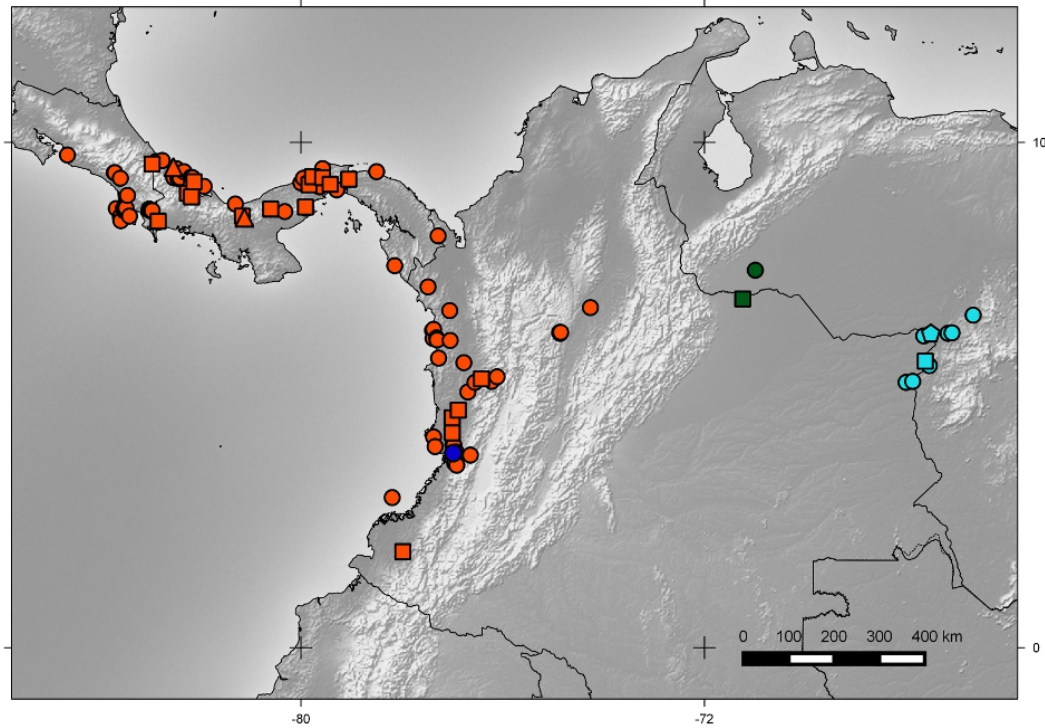
**Figura 6.** Distribuição de *Loxopholis percarinatum* (amarelo) e populações bissexuais de *Loxopholis percarinatum* (vermelho – ver Apêndice 1). Diamantes: pontos com dados sobre morfologia e genética; triângulos: só genética; quadrados: só morfologia; círculos: outros registros (literatura e GBIF).



**Figura 7.** Detalhe do contato entre as distribuições de *Loxopholis percarinatum* (amarelo), *Loxopholis guianense* (vermelho) e *Loxopholis osvaldoi* (azul). Diamantes: pontos com dados sobre morfologia e genética; triângulos: só genética; quadrados: só morfologia; círculos: outros registros (literatura e GBIF).

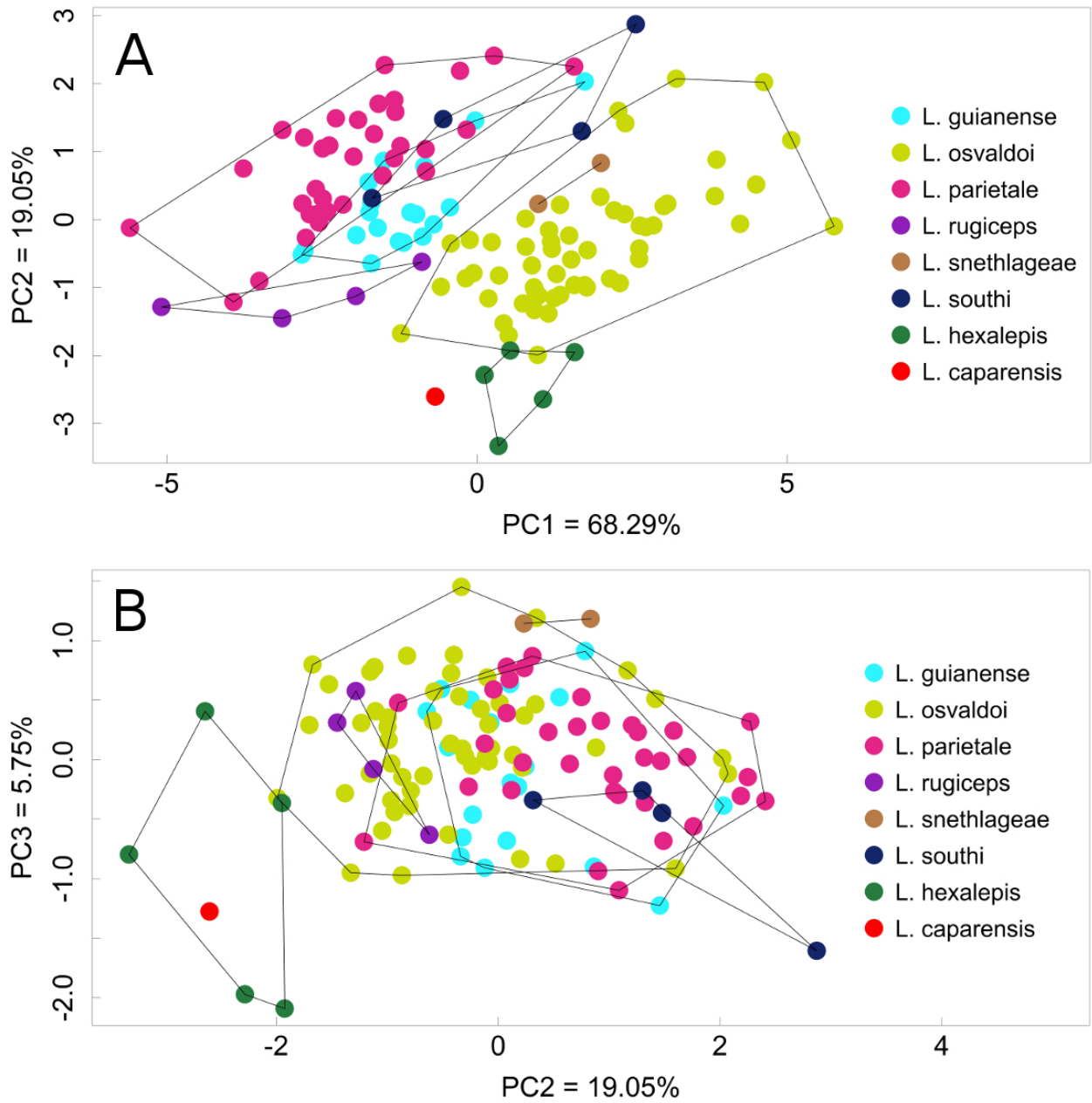


**Figura 8.** Distribuição de *Loxopholis rugiceps* (laranja). Diamantes: pontos com dados sobre morfologia e genética; triângulos: só genética; quadrados: só morfologia; círculos: outros registros (literatura e GBIF).

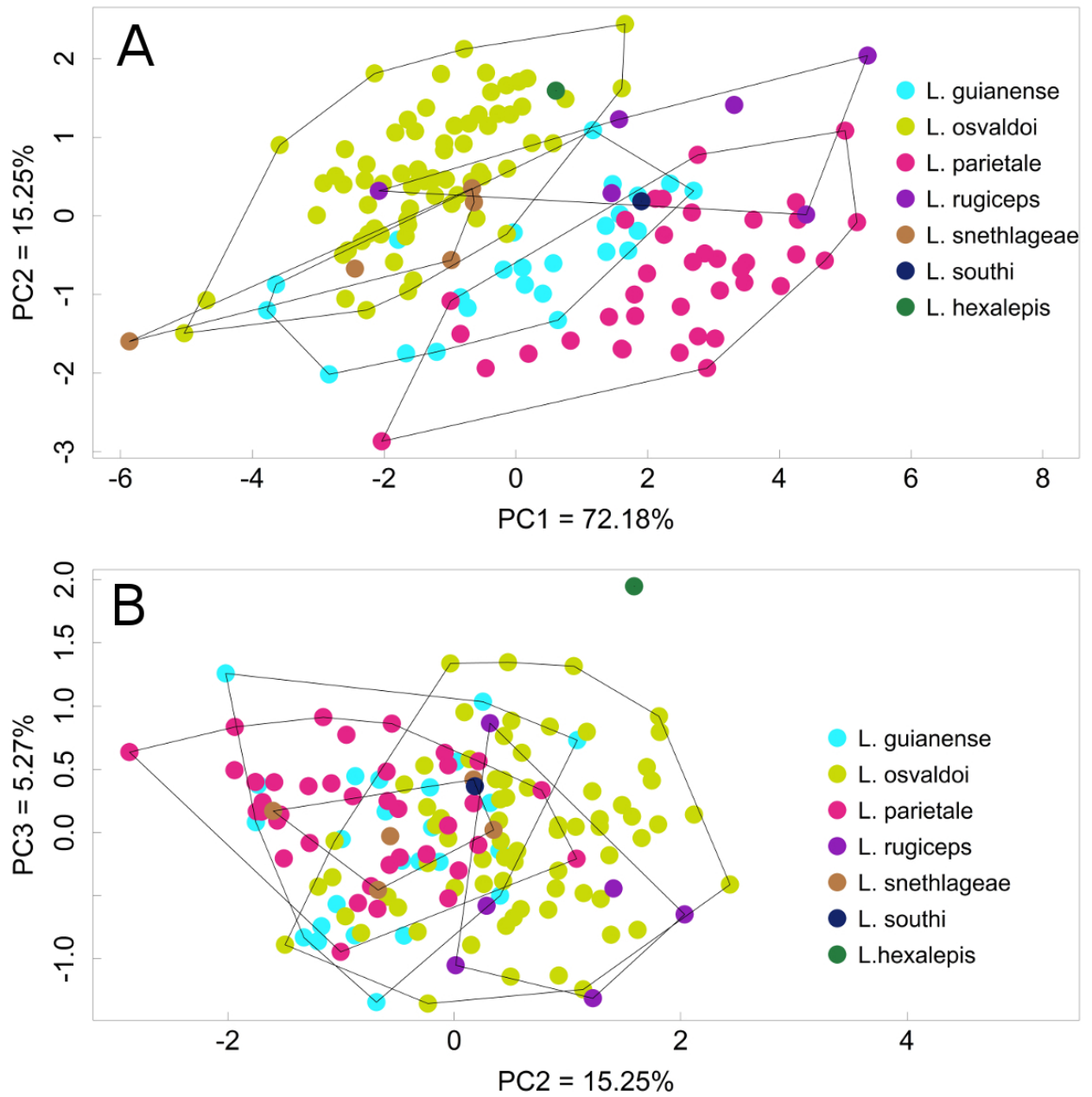


**Figura 9.** Distribuição de *Loxopholis southi* (laranja), *Loxopholis ioanna* (azul escuro), *Loxopholis caparensis* (verde) e *Loxopholis hexalepis* (azul). Diamantes: pontos com dados sobre morfologia e genética; triângulos: só genética; quadrados: só morfologia; círculos: outros registros (literatura e GBIF).

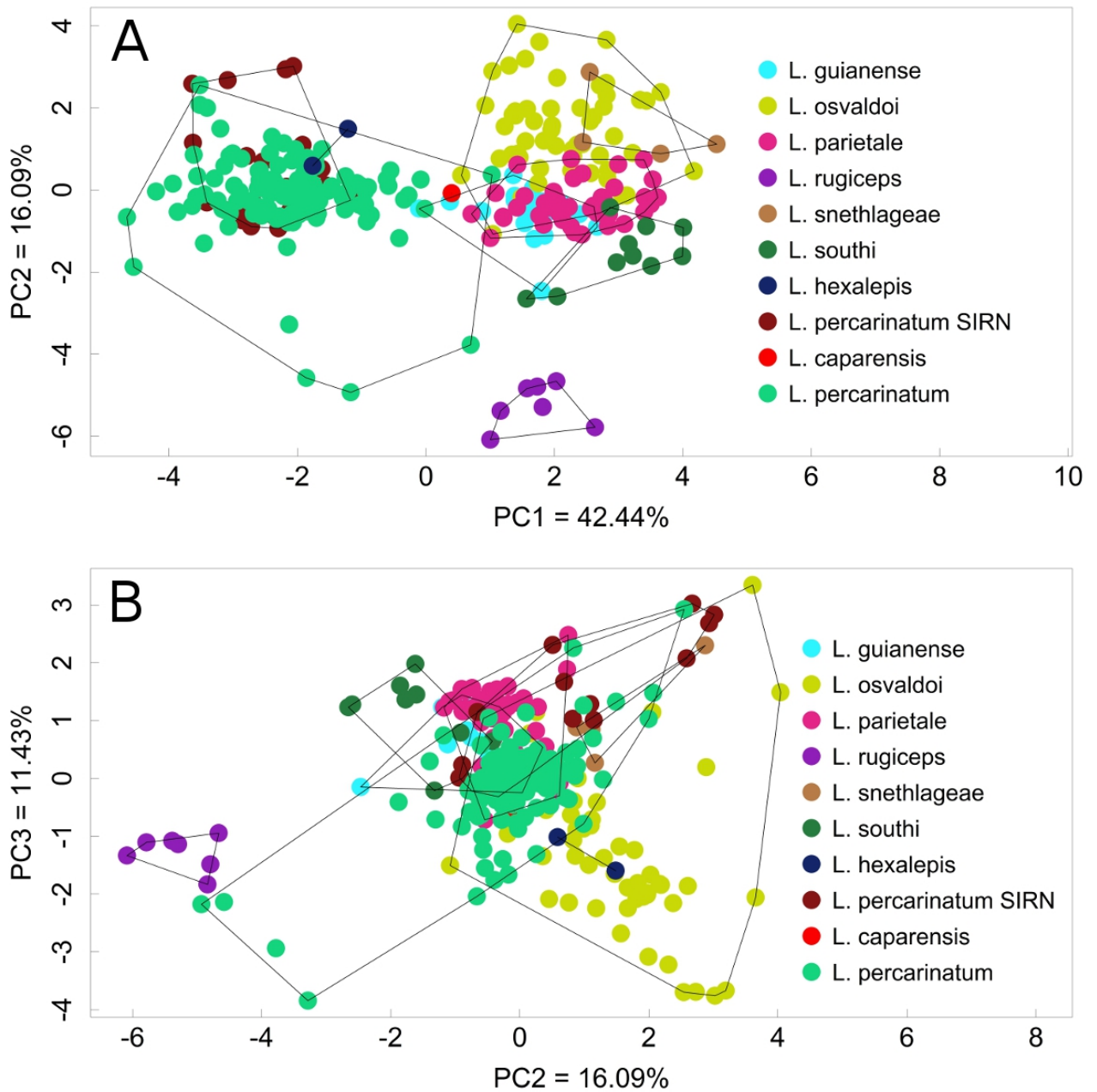




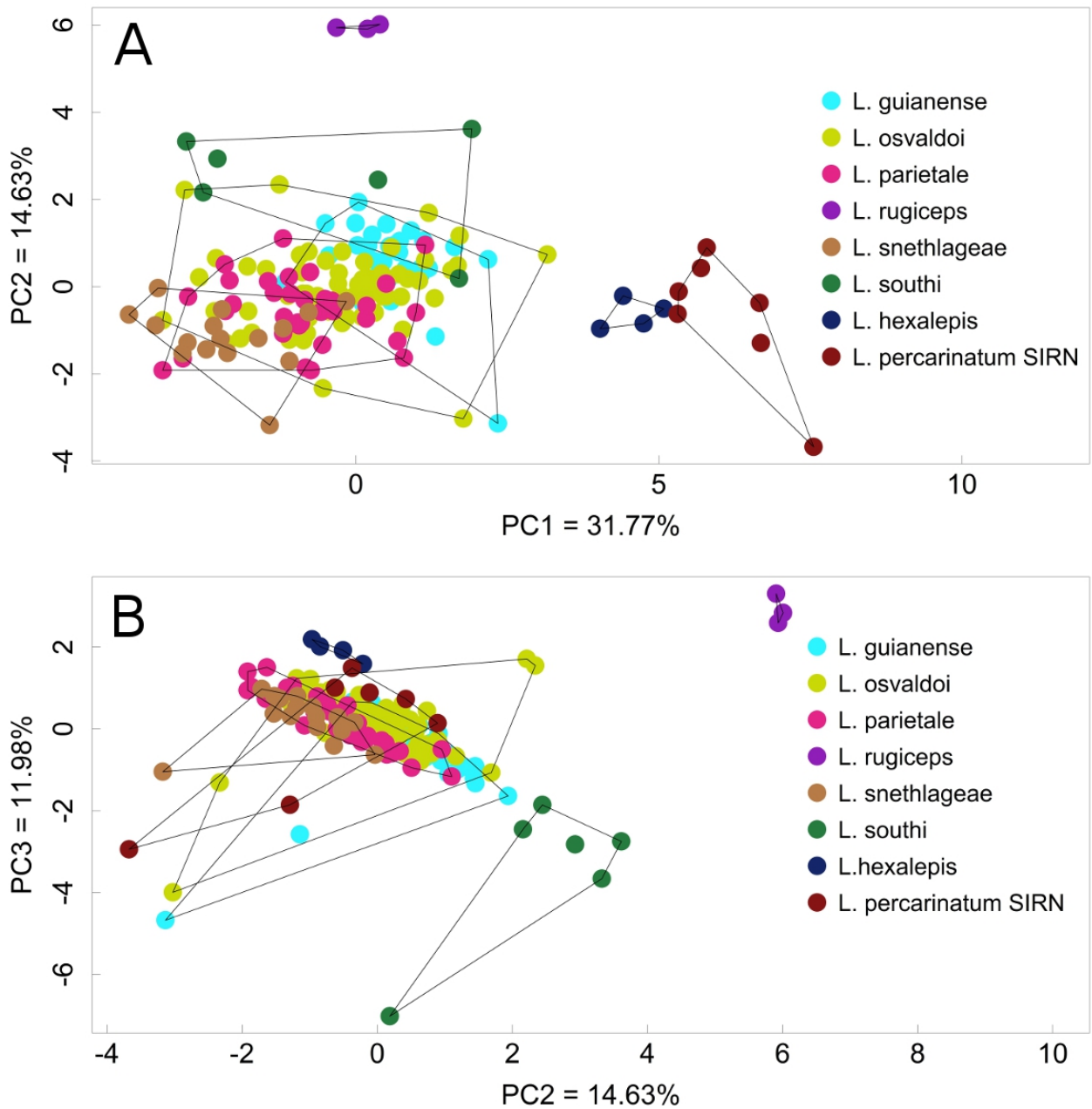
**Figura 10.** Scatterplot do 1º e 2º eixo (A) e 2º e 3º eixo (B) da Análise de Componentes Principais (PCA) realizada com os dados morfométricos das fêmeas de *Loxopholis*.



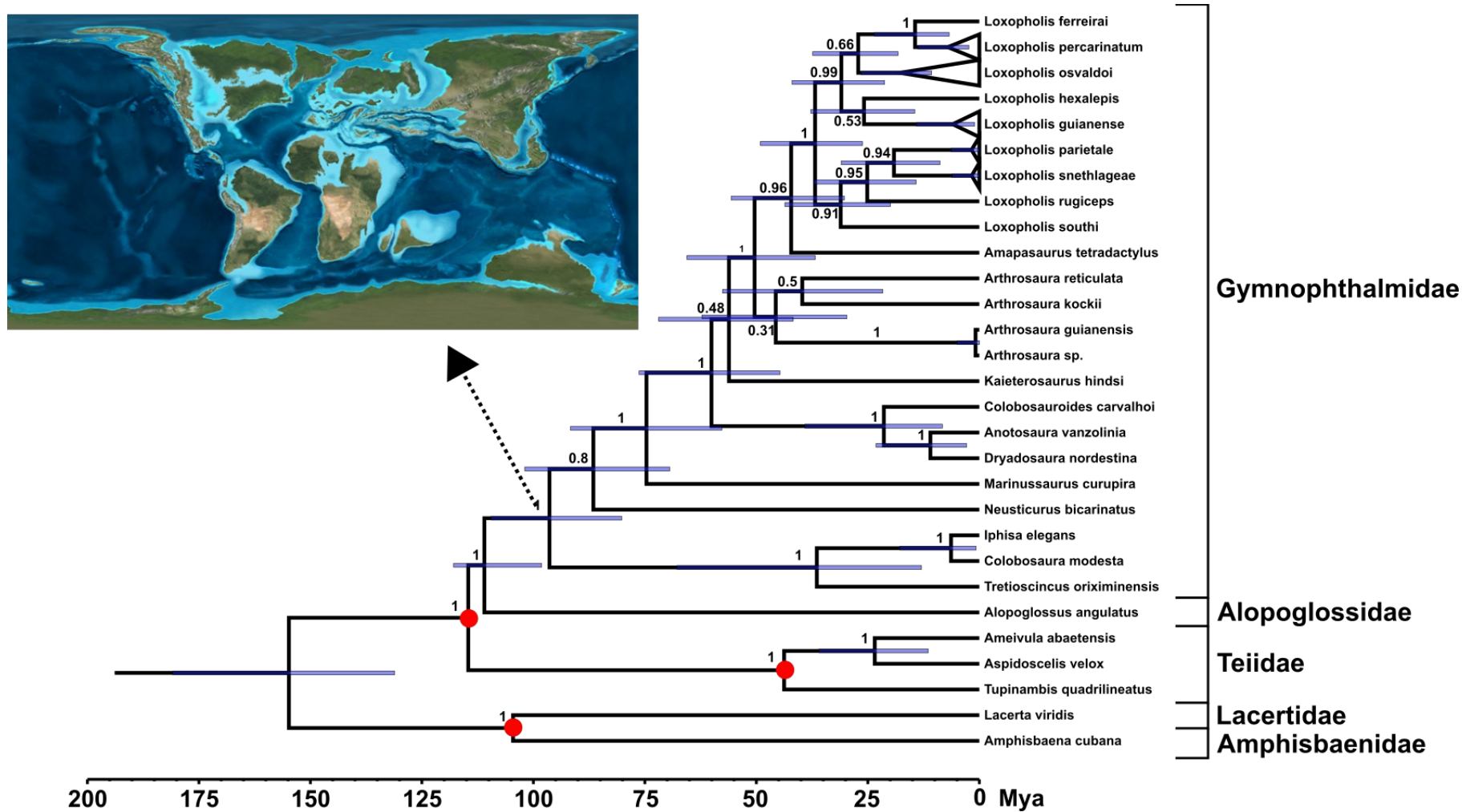
**Figura 11.** Scatterplot do 1º e 2º eixo (A) e 2º e 3º eixo (B) da Análise de Componentes Principais (PCA) realizada com os dados morfométricos dos machos de *Loxopholis*.



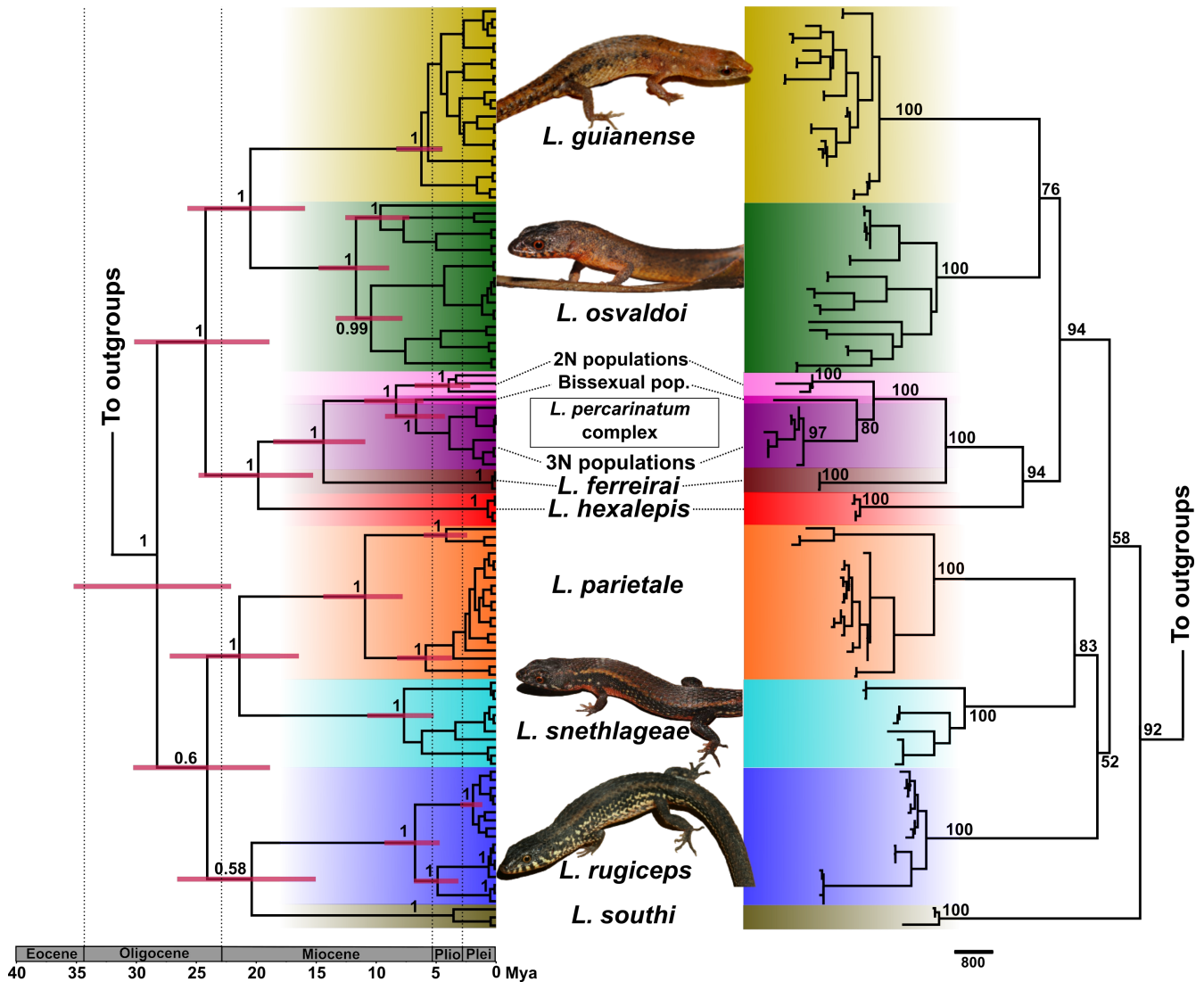
**Figura 12.** Scatterplot do 1º e 2º eixo (A) e 2º e 3º eixo (B) da Análise de Componentes Principais (PCA) realizada com os dados merísticos das fêmeas de *Loxopholis*.



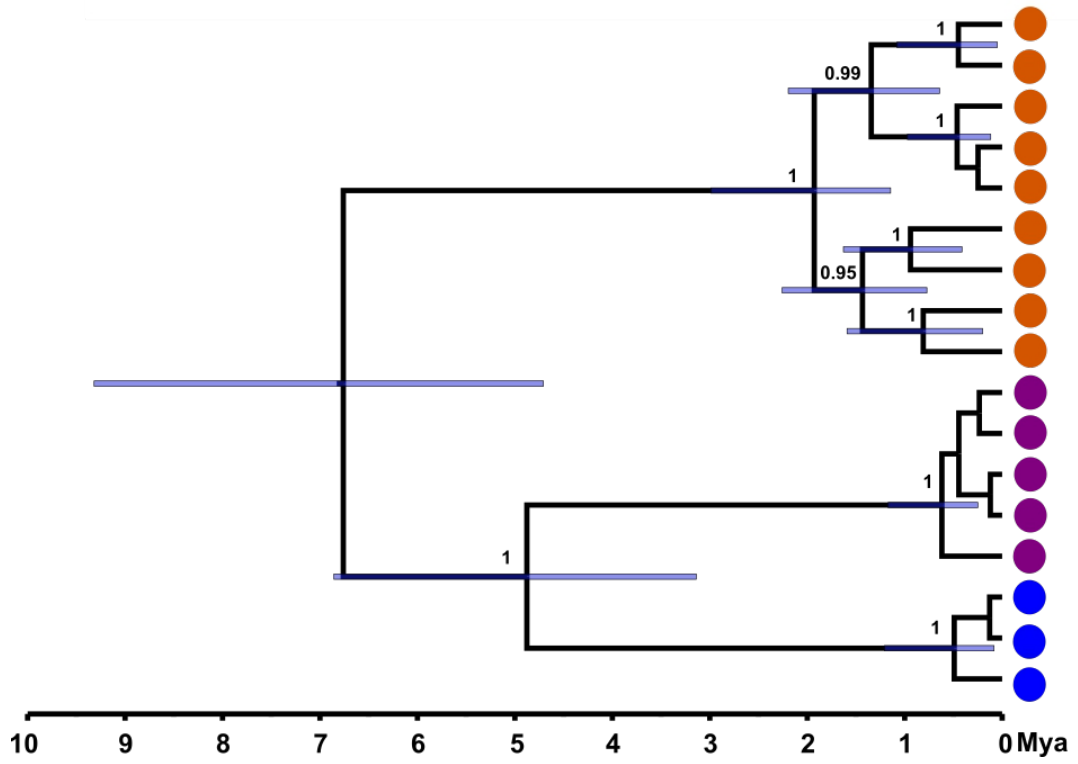
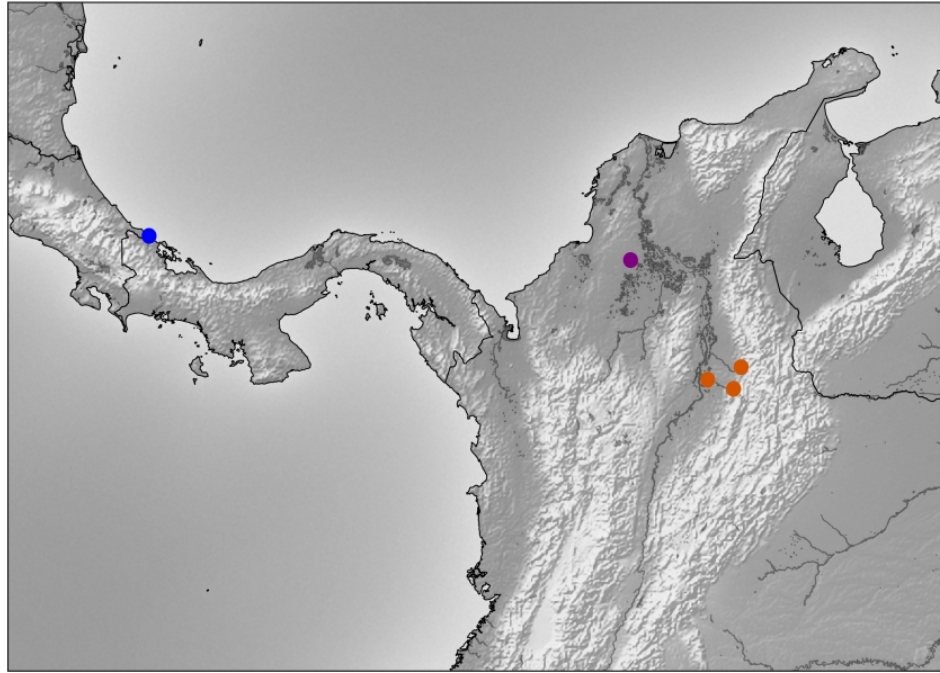
**Figura 13.** Scatterplot do 1º e 2º eixo (A) e 2º e 3º eixo (B) da Análise de Componentes Principais (PCA) realizada com os dados merísticos dos machos de *Loxopholis*.



**Figura 14.** Arvore datada de máxima credibilidade de clados (MCC) resultante da análise no BEAST utilizando apenas o gene NT3 e com calibração por fóssil. Os nós onde a calibração foi realizada estão em vermelho (ver texto para detalhes). Valores posteriores aos nós representam a probabilidade posterior. O mapa mostra a posição dos continentes durante o Cretáceo superior, c.a. 90 Ma (Mapa: By Colorado Plateau Geosystems, Inc. - [http://cpgeosystems.com/rect\\_globe.html](http://cpgeosystems.com/rect_globe.html), CC BY-SA 4.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=49013665>).



**Figura 15.** À esquerda, árvore datada de máxima credibilidade de clados resultante da análise IBT (ver texto), utilizando 2 marcadores nucleares (12s e CYTB) e 3 marcadores nucleares (NT3, KIAA2018, RAG1) concatenados. À direita, árvore de Máxima Verosimilhança (ML) construída a partir da mesma matriz, utilizando o programa RaxML. Valores posteriores aos nós da árvore IBT representam a probabilidade posterior, e na ML, bootstrap. Plio-Plioceno; Plei-Pleistoceno.



**Figura 16.** Acima o mapa mostrando a localização geográfica das amostras de *Loxopholis rugiceps* sequenciadas neste estudo. Abaixo, as relações filogenéticas e tempo de diversificação (extraídas da figura 11) entre as três regiões amostradas.



## 2.7. Tabelas

**Tabela 1.** Amostras sequenciadas no âmbito deste estudo.

#	Voucher	Espécie	Localidade	12s	CYTB	NT3	KIAA201 8	RAG1
1	RF 76	<i>Alopoglossus angulatus</i>	Silves, AM	s	s	s	s	s
2	MPEG 25098	<i>Amapasaurus tetradactylus</i>	Óbidos, PA	s	n	s	s	n
3	MTR 907989	<i>Anotosaura vanzolinia</i>	Cabaceiras, PB	s	n	s	s	s
4	PK1409	<i>Arthrosaura guianensis</i>	Kaieteur Nt. Park, Guyana	s	s	s	s	s
5	977924	<i>Arthrosaura kockii</i>	Vila Rica, MT	s	s	s	s	s
6	MTR976977	<i>Arthrosaura reticulata</i>	Juruena, MT	s	n	s	s	s
7	PK2031	<i>Arthrosaura sp.</i>	Maringma Tepuy, Guyana	s	s	s	s	s
8	LG 2129	<i>Colobosauroides carvalhoi</i>	Ibiapaba, CE	s	n	s	s	s
9	LG 1479	<i>Dryadosaura nordestina</i>	Mamanguape, PB	s	s	s	s	s
10	LG 2087	<i>Ecpleopus gaudichaudii</i>	Juquitiba, SP	n	s	n	n	n
11	MTR 10210	<i>Iphisa elegans</i>	Cachoeira das Pombas, AM	n	s	s	n	s
12	MTR 09984	<i>Kaieteurosaurus hindsii</i>	Kaiteur National Park, Guyana	s	s	s	s	n
13	MSH 10268	<i>Loxopholis ferreirai</i>	E.E Anavilhanas, AM	s	s	s	n	s
14	MSH 10269	<i>Loxopholis ferreirai</i>	E.E Anavilhanas, AM	s	s	s	n	s
15	MRT 6290	<i>Loxopholis guianense</i>	Igarapé Camaipi, Rio Maracá, AP	s	n	s	s	s
16	MRT 6311	<i>Loxopholis guianense</i>	Igarapé Camaipi, Rio Maracá, AP	s	s	s	n	s
17	CTMZ 10557	<i>Loxopholis guianense</i>	REBIO Tapirapé, Marabá, PA	s	s	s	s	s
18	MTR 23318	<i>Loxopholis guianense</i>	REBio do Gurupi, MA	s	s	s	n	s

19	MPEG 22059	<i>Loxopholis guianense</i>	Almeirim, Monte Dourado. Área 91, PA	s	s	s	s	s
20	MPEG 27198	<i>Loxopholis guianense</i>	FLOTA Faro, Faro, PA	s	s	s	s	s
21	MPEG 27406	<i>Loxopholis guianense</i>	Serra do Acarai, Oriximiná, PA	s	s	s	s	s
22	AF 756	<i>Loxopholis guianense</i>	Saut Maripa, Guiana Francesa	s	n	s	s	s
23	CTMZ 10558	<i>Loxopholis guianense</i>	REBIO Tapirapé, Marabá, PA	n	s	s	n	n
24	MTR 13868	<i>Loxopholis guianense</i>	Lourenço, AP	s	s	s	n	n
25	MTR 13869	<i>Loxopholis guianense</i>	Lourenço, AP	s	s	s	n	n
26	MTR 13944	<i>Loxopholis guianense</i>	Laranjal do Jari, AP	n	n	n	n	n
27	HERP 2713/MPE G 19055	<i>Loxopholis guianense</i>	Porto Trombetas, PA	s	s	s	n	n
28	MPEG 27199	<i>Loxopholis guianense</i>	FLOTA Faro, Faro, PA	s	s	s	s	n
29	MPEG 27405	<i>Loxopholis guianense</i>	Serra do Acarai, Oriximiná, PA	s	s	s	s	n
30	JDL 31440	<i>Loxopholis hexalepis</i>	Puerto Carreño, departamento de Vichada, Colombia	s	s	s	n	s
31	JDL 31442	<i>Loxopholis hexalepis</i>	Puerto Carreño, departamento de Vichada, Colombia	s	s	s	n	s
32	JDL 31307	<i>Loxopholis hexalepis</i>	Puerto Carreño, departamento de Vichada, Colombia	s	s	s	s	s
33	MSH 10328	<i>Loxopholis osvaldoi</i>	E.E Anavilhanas, AM	s	s	s	s	s
34	MTR 18712	<i>Loxopholis osvaldoi</i>	Lago Chaviana, MD Rio Purus, AM	s	s	s	s	s
35	MTR 25940	<i>Loxopholis osvaldoi</i>	PARNA Pacaás Novos, RO	s	s	s	s	s
36	MTR 25949	<i>Loxopholis osvaldoi</i>	PARNA Pacaás Novos, RO	s	n	s	s	s

37	CTGAL 121	<i>Loxopholis osvaldoi</i>	Lago da Velha, Rio Jatapú, AM	s	s	s	n	n
38	UNIBAN 1662	<i>Loxopholis osvaldoi</i>	Montenegro - Cacaulandia, RO	s	s	s	s	n
39	MTR 10150	<i>Loxopholis osvaldoi</i>	Cachoeira das Pombas, AM	s	s	s	s	n
40	MTR 19090	<i>Loxopholis osvaldoi</i>	Moiobamba-AM	s	s	s	s	n
41	MPEG 27647	<i>Loxopholis osvaldoi</i>	Maués, Bragança. Rio Paraconi, PA	s	s	s	s	n
42	SMS 030	<i>Loxopholis osvaldoi</i>	Comunidade Projó, margem esquerda rio Aripuanã, AM	s	s	s	s	n
43	SMS 039	<i>Loxopholis osvaldoi</i>	Comunidade Projó, margem direita rio Aripuanã, AM	s	s	s	s	n
44	CORBIDI 9522	<i>Loxopholis parietalis</i>	Distrito Río Santiago, Quebrada Katerpiza, Amazonas, Peru	s	s	s	n	s
45	CORBIDI 8710	<i>Loxopholis parietalis</i>	Sargento Puño, Loreto, Peru	s	s	s	n	s
46	LSU 12547	<i>Loxopholis parietalis</i>	Reserva Faunistica Cuyabeno, Ecuador	s	n	s	n	s
47	LSU 12561	<i>Loxopholis parietalis</i>	Reserva Faunistica Cuyabeno, Ecuador	s	s	s	n	s
48	LSU 12602	<i>Loxopholis parietalis</i>	Reserva Faunistica Cuyabeno, Ecuador	s	s	s	n	s
49	LSU 12634	<i>Loxopholis parietalis</i>	Reserva Faunistica Cuyabeno, Ecuador	n	s	s	n	s
50	DHMECN 7500	<i>Loxopholis parietalis</i>	Cooperativa la Balsareña, Lago Agrio, Dureno, Ecuador	s	s	s	n	s
51	DHMECN 7808	<i>Loxopholis parietalis</i>	Santa Elena, Lago Agrio, Dureno, Ecuador	s	s	s	n	s
52	DHMECN 8297	<i>Loxopholis parietalis</i>	Reserva Ecologica Cofan Bermejo, Lago Agrio, Cascales, Ecuador	n	s	s	s	s

53	DHMECN 8298	<i>Loxopholis parietalis</i>	Reserva Ecologica Cofan Bermejo, Lago Agrio, Cascales, Ecuador	s	s	s	n	n
54	DHMECN 7807	<i>Loxopholis parietalis</i>	Santa Elena, Lago Agrio, Dureno, Ecuador	n	s	s	n	n
55	TM 411	<i>Loxopholis percarinatum</i>	Guarantã do Norte, MT	s	s	s	s	s
56	MPEG 28153	<i>Loxopholis percarinatum</i>	Jutaí, RDS Cujubim. Boa Vista, AM	s	s	s	s	s
57	CTMZ 12175	<i>Loxopholis percarinatum</i>	Guyana	s	s	s	s	s
58	MTR 15344	<i>Loxopholis percarinatum</i>	Rebio Trombetas, PA	n	s	n	n	n
59	CTMZ 12172	<i>Loxopholis percarinatum</i>	Guyana	s	s	s	s	n
60	CTMZ 12174	<i>Loxopholis percarinatum</i>	Guyana	s	s	s	s	n
61	EH 346	<i>Loxopholis rugiceps</i>	Departamento de Sucre, municipio de Gabras, Finca, Colombia	s	s	s	s	s
62	EH 347	<i>Loxopholis rugiceps</i>	Departamento de Sucre, municipio de Gabras, Finca, Colombia	s	s	s	s	s
63	JDL 29510	<i>Loxopholis rugiceps</i>	Puerto Wilches, corregimiento Sogamoso, Santander, Colombia	s	s	s	s	s
64	JDL 29511	<i>Loxopholis rugiceps</i>	Puerto Wilches, corregimiento Sogamoso, Santander, Colombia	s	s	s	s	s
65	JDL 29512	<i>Loxopholis rugiceps</i>	Puerto Wilches, corregimiento Sogamoso, Santander,	s	s	s	n	s

			Colombia					
66	JDL 29648	<i>Loxopholis rugiceps</i>	El Playón, Vereda San Pedro de la Tigra, 820m, Santander, Colombia	s	s	s	n	s
67	JDL 29575	<i>Loxopholis rugiceps</i>	Girón, Hidroeléctrica río Sogamoso, Santander, Colombia	s	s	s	s	n
68	EH 348	<i>Loxopholis rugiceps</i>	Colombia, Departamento de Sucre, municipio de Gabras, Finca	s	s	s	s	n
69	SL 533	<i>Loxopholis rugiceps</i>	San San Pond Sak: Boca San San, Panamá	s	s	s	n	n
70	SL 534	<i>Loxopholis rugiceps</i>	San San Pond Sak: Boca San San, Panamá	s	s	s	s	n
71	MPEG 28147	<i>Loxopholis snethlageae</i>	Jutaí, RDS Cujubim, Boa Vista, AM	n	s	s	n	s
72	MTR 33655	<i>Loxopholis snethlageae</i>	Japurá, Trilha de Santa Fé, AM	s	s	s	n	s
73	MTR 33557	<i>Loxopholis snethlageae</i>	Maraã, Trilha do Castanhal, AM	s	s	s	n	s
74	CTGA - L - 425	<i>Loxopholis snethlageae</i>	Comunidade Turiaçú, REBIO Abufari, ME Ro Purus, AM	s	n	s	s	n
75	CTGA - L - 426	<i>Loxopholis snethlageae</i>	Comunidade Turiaçú, REBIO Abufari, ME Ro Purus, AM	s	s	s	n	n
76	CTGA - L - 430	<i>Loxopholis snethlageae</i>	Comunidade Turiaçú, REBIO Abufari, ME Ro Purus, AM	s	n	s	n	n

77	MTR 33712	<i>Loxopholis snethlageae</i>	Japurá, Trilha da Anta, AM	s	s	s	n	n	
78	MTR 33542	<i>Loxopholis snethlageae</i>	Maraã, Trilha do Castanhal, AM	s	s	s	n	n	
79	SL 556	<i>Loxopholis southi</i>	San San Pond Sak: Rio Negro, Panamá	n	s	s	n	s	
80	LST 0097	<i>Loxopholis southi</i>	Alto de Piedra/Cerro Mariposa, Panamá	n	n	s	n	n	
81	SL 557	<i>Loxopholis southi</i>	San San Pond Sak: Rio Negro, Panamá	n	s	s	n	n	
82	INPA 19855	<i>Marinussaurus curupira</i>	Iranduba, AM	s	n	s	n	s	
83	INPA 19856	<i>Marinussaurus curupira</i>	Iranduba, AM	n	n	n	n	n	
84	MTR 25541	<i>Neusticurus bicarinatus</i>	PARNA Pacaás Novos, RO	s	s	s	s	s	
85	926415	<i>Tretioscincus oriximinesis</i>	Poçoão, PA	s	s	s	s	s	
				<b>Seqs que deram certo</b>	<b>72</b>	<b>71</b>	<b>81</b>	<b>45</b>	<b>51</b>
				<b>missing data</b>	<b>25.00%</b>	<b>26.04%</b>	<b>15.63%</b>	<b>53.13%</b>	<b>46.88%</b>

**Tabela 2.** Variáveis merísticas analisadas. Na primeira coluna por espécie, os valores máximos e mínimos e o valor da média entre parênteses. A segunda coluna representa o número de espécimes analisado por variável por espécie.

Variável	<i>L. caparensis</i>		<i>L. guianensis</i>		<i>L. osvaldoi</i>		<i>L. percarinatum</i>		<i>L. ferreirai*</i>		<i>L. hexalepis</i>		<i>L. parietale</i>		<i>L. snethlageae</i>		<i>L. southi</i>		<i>L. rugiceps</i>	
Escamas na cinta	27-26	2	26-22 (24)	89	29-24 (26.3)	143	28-24 (25.6)	164	30-33	2	36-32 (33.1)	12	26-21 (24.1)	96	28-23 (25.2)	25	23-20 (21.4)	17	24-20 (21.7)	16
Dorsais longitudinal	34-33	2	34-30 (32.1)	88	36-30 (32.6)	144	44-35 (37.5)	166	42-44	2	35-33 (33.7)	12	37-30 (33.6)	97	36-29 (33.6)	25	32-27 (29)	17	31-28 (29)	16
Ventraís longitudinal	23-23	2	25-20 (21.9)	87	24-20 (22)	143	27-22 (24.6)	166	26-27	2	25-23 (23.9)	12	24-20 (21.5)	95	23-20 (21.5)	25	23-17 (19.7)	17	24-20 (22.2)	16
Fileiras de gulares	9-9	2	11-8 (9.3)	89	11-7 (9)	144	12-8 (10.2)	166	13	1	10-8 (8.7)	12	11-8 (9.4)	97	10-8 (9.2)	25	9-7 (8.1)	17	10-8 (9)	17
Poros pré-cloacal machos	-	-	4	55	4-2	83	4	8	4	1	4	5	4	48	4	18	4	6	4	7
Poros pré-cloacal fêmeas	2	1	4-0	35	4-0	61	4-0	151	1	1	2-0	7	4-0	42	2	6	4-0	11	2-0	9
Poros femorais machos	-	-	13-10	55	14-10	83	11-9	8	8	1	13-12	5	16-11	48	12-8	18	10-8	6	10-8	7
Poros femorais fêmeas	0	1	0	35	6-0	61	0	151	0	1	0	7	0	42	0	6	0	11	0	9
Lamelas 4o artelho direito	12-12	2	12-10 (11)	88	12-9 (10.7)	139	15-10 (12.4)	165	13-15	2	13-12 (12.3)	12	12-9 (10.6)	94	11-9 (9.6)	25	13-9 (11)	16	14-11 (12.2)	16
Lamelas 4o artelho esquerdo	-	-	12-10 (11)	69	12-9 (10.7)	128	15-10 (12.5)	29	-	-	-	-	12-9 (10.7)	83	11-8 (9.4)	25	11-10 (10.6)	5	14-11 (12.2)	15
Lamelas 4o dedo direito	17-17	2	18-14 (16.1)	90	18-13 (15.2)	137	21-16 (18.6)	164	19-21	2	20-17 (18.3)	12	16-13 (14.4)	96	15-13 (13.3)	24	18-14 (15.6)	17	19-15 (16.7)	16
Lamelas 4o dedo esquerdo	-	-	17-15 (15.9)	68	18-13 (15.1)	125	22-15 (18.1)	26	-	-	-	-	16-13 (14.5)	78	14-12 (13.3)	24	17-13 (15.2)	5	18-15 (16.8)	14
Suboculares+pósoculares	7-7	2	12-8 (9.6)	76	13-8 (10.2)	129	13-8 (11.2)	114	12	1	9-8 (8.6)	5	12-8 (9.6)	86	11-9 (9.6)	25	10-8 (9.4)	5	10-8 (9.3)	15
Supraciliares direito	4-4	2	5-2 (4.21)	77	6-4 (4.7)	129	7-4 (5.7)	113	5	1	5-5 (5)	6	5-4 (4.2)	86	5-3 (4.4)	24	5-4 (4.2)	5	5-4 (4)	15
Supraciliares esquerdo	-	-	5-3 (4.2)	57	6-3 (4.6)	129	5-4 (4.9)	30	-	-	-	-	6-2 (4.2)	86	6-4 (4.6)	25	4-4 (4)	5	5-4 (4)	15
Pós-supraoculares direito	1-1	2	3-1 (2)	77	4-1 (2)	129	3-0 (1.4)	113	1	1	1-0 (0.6)	5	4-0 (1.95)	86	5-2 (2.8)	24	3-1 (2)	5	1-1 (1)	15
Pós-supraoculares esquerdo	1-1	2	3-1 (2)	77	5-1 (2)	129	3-0 (1.4)	113	1	1	1-0 (0.6)	5	4-1 (1.94)	86	4-2 (2.8)	25	2-1 (1.8)	5	1-1 (1)	15
Sublabiais	5-5	2	6-4 (5)	80	6-5 (5)	131	7-4 (5.8)	166	5	1	6-5 (5.9)	12	6-4 (5)	97	6-4 (5)	25	6-5 (5.1)	17	5-5 (5)	17
Supralabiais direita	6-6	2	7-5 (6)	77	7-5 (6)	129	7-5 (6.1)	137	6	1	6-6 (6)	6	7-5 (6)	91	7-5 (6)	25	6-6 (6)	5	5-5 (5)	15
Supralabiais esquerda	7-6	2	7-6 (6)	80	7-5 (6)	132	7-5 (6.1)	166	-	-	6-6 (6)	12	6-6 (6)	102	6-6 (6)	25	7-5 (6)	17	5-5 (5)	17
Escamas em contato com 2º escudo gular e sublabiais direito	1-1	2	1-0 (0.9)	77	1-0 (0.9)	129	3-1 (1.1)	137	1	1	1-1 (1)	6	1-0 (0.9)	86	1-1 (1)	25	2-1 (1.8)	5	1-0 (0.8)	15
Escamas em contato com 2º escudo gular e sublabiais esquerdo	1-1	2	1-0 (0.9)	77	1-0 (0.9)	129	2-1 (1.1)	137	-	-	1-0 (0.8)	6	1-0 (0.9)	86	1-1 (1)	25	2-2 (2)	5	1-0 (0.8)	15
Escamas entre ultimo escudo gular e fileira de gulares	14-11	2	15-5 (9.5)	36	15-12 (13.5)	4	31-7 (16.2)	134	18	1	16-12 (13.6)	6	16-4 (9.7)	76	16-5 (9.7)	4	-	-	16-7 (9.9)	13
Supraoculares	-	-	4-4 (4)	76	4-3 (3.99)	129	4-4 (4)	29	4	1	-	-	4-4 (4)	91	4-4 (4)	25	4-4 (4)	5	4-4 (4)	15
Razão entre o tamanho do contato das prefrontais e frontoparietais	-	-	2 – 0.7 (1.1)	60	2 – 0.4 (0.8)	78	0.6-0.4 (0.5)	4	-	-	-	-	1.5 - 0.4 (0.9)	37	1.4 – 0.5 (0.9)	17	-	-	0.82-0.58	2
Razão entre o comprimento e a largura da interparietal	-	-	1.3 – 0.9 (1)	59	1.3 – 0.8 (1)	79	1.2-1 (1.1)	4	-	-	-	-	1.5 – 0.9 (1.2)	37	1.2 – 0.9 (1)	16	-	-	1.3 – 1.1	2

\* Dados obtidos de Rodrigues & Avila-Pires 2005

**Tabela 3.** Variáveis categóricas medidas, proporção de espécime por categoria e o número de indivíduos analisados (coluna a esquerda) por variável por espécie.

Variável	Categorias	<i>L. guianense</i>	<i>L. caparensis</i>	<i>L. hexalepis</i>	<i>L. osvaldoi</i>	<i>L. parietale</i>	<i>L. rugiceps</i>	<i>L. snethlageae</i>	<i>L. southi</i>
Escamação pré-cloacal	1+3	2.5%	0%	0%	0%	1.1%	13.3%	0%	0%
	1+4	26.6%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
	1+5	54.4%	100%	83.3%	92.2%	92.4%	86.7%	91.7%	100%
	1+6	0%	0%	0%	0.8%	1.1%	0%	0%	0%
	1+7	0%	0%	16.7%	0.8%	0%	0%	0%	0%
	2+5	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
	3	2.5%	0%	0%	0.8%	0%	0%	0%	0%
	4	6.3%	0%	0%	0.8%	0%	0%	0%	0%
	4+1	1.3%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
	5	5.1%	0%	0%	3.9%	5.4%	0%	8.3%	0%
5+2	0%	0%	0%	0.8%	0%	0%	0%	0%	
6+1	1.3%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	
Escamas pré-cloacal quilhadas	lisas	30.4%	50%	100%	42.6%	28.3%	78.6%	58.3%	0%
	lev. quilhadas	32.9%	50%	0%	32.6%	8.7%	14.3%	37.5%	40%
Forma das dorsais na linha médio-dorsal	quilhadas	36.7%	0%	0%	24.8%	63%	7.1%	4.2%	60%
	hexagono	35.5%	100%	0%	100%	0%	60%	87.5%	40%
	losango	52.6%	0%	0%	0%	100%	33.3%	12.5%	60%
	hexagono e losango	11.8%	0%	0%	0%	0%	6.7%	0%	0%
Dimensões das dorsais	quadrangular	0%	0%	100%	0%	0%	0%	0%	0%
	Mais comprida que larga	4.8%	100%	100%	100%	0%	0%	87.5%	0%
Dorsais mucronadas ou lanceoladas?	Tão larga quanto comprida	95.2%	0%	0%	0%	100%	100%	12.5%	100%
	lanceolada	14.3%	0%	0%	0%	8.7%	-	0%	-
Ventrais quilhadas?	mucronada	85.7%	100%	100%	100%	91.3%	-	100%	-
	lisas	0%	50%	100%	9.2%	1.2%	62.5%	0%	0%
Ventrais imbricadas ou justapostas	lev. quilhadas	23.4%	0%	0%	48.9%	4.7%	37.5%	8%	0%
	quilhadas	76.6%	50%	0%	42%	94.2%	0%	92%	100%
	imbricadas	100%	0%	0%	89.2%	100%	100%	88%	100%
Primeiras fileiras de gulares regular?	lev. imbricadas	0%	100%	0%	10.8%	0%	0%	12%	0%
	justapostas	0%	0%	100%	0%	0%	0%	0%	0%
Loreal alcança a 2ª supralabial direita	sim	87%	100%	16.7%	86%	72.1%	73.3%	64%	80%
	não	13%	0%	83.3%	14%	27.9%	26.7%	36%	20%
Loreal alcança a 2ª supralabial esquerda	quase	16.7%	0%	0%	3.8%	12.2%	0%	16%	0%
	sim	5.2%	0%	0%	0%	1.1%	0%	8%	0%
	não	93.8%	100%	100%	99.2%	97.8%	100%	92%	100%
Tamanho loreal direita	quase	1%	0%	0%	0%	2.2%	0%	0%	0%
	sim	5.2%	0%	0%	0.8%	0%	0%	8%	0%
	p	4.2%	-	-	8.5%	24.4%	0%	0%	20%
Tamanho loreal esquerda	m	58.3%	-	-	59.6%	65.9%	100%	14.3%	80%
	g	37.5%	-	-	31.9%	9.8%	0%	85.7%	0%
	p	2.1%	-	-	0%	3.1%	0%	7.1%	20%
Temporais quilhadas?	m	57.4%	-	-	65.1%	89.2%	100%	7.1%	80%
	g	40.4%	-	-	34.9%	7.7%	0%	85.7%	0%
	lisas	0%	0%	50%	0%	0%	0%	0%	0%
Escamas do pescoço	lev. quilhadas	20%	100%	50%	15.2%	1.2%	0%	0%	80%
	quilhadas	80%	0%	0%	84.8%	98.8%	100%	100%	20%
6ª supralabial estriada?	desenvolvidas	0%	-	0%	0%	0%	100%	0%	0%
	grânulos	100%	100%	100%	100%	100%	0%	100%	100%
	sim	2.7%	0%	0%	31.8%	100%	0%	76%	100%
Comprimento relativo da escama pós-supralabial com as temporais	levemente	4%	0%	0%	0.8%	0%	0%	4%	0%
	não	93.3%	100%	100%	67.4%	0%	100%	20%	0%
	distintamente maior	93.6%	100%	100%	3.8%	8.8%	23.5%	0%	5.9%
Comissura da boca	pouco maior / igual	6.3%	0%	0%	96.2%	91.2%	76.5%	100%	94.2%
	6ª supralabial	0%	0%	0%	1.5%	0%	0%	100%	0%
4º escudo gular esquerdo	Esc. posterior	100%	100%	100%	98.5%	100%	100%	0%	100%
	grande	52.5%	0%	0%	1.5%	98%	100%	83.4%	0%
	levemente distinguível ou reduzido	47.6%	100%	100%	98.5%	2%	0%	16.6%	100%



Variavel	Categorias	L. guianense	L. caparensis	L. hexalepis	L. osvaldoi	L. parietale	L. rugiceps	L. snethlageae	L. southi									
4º escudo gular esquerdo	grande	52.5%	80	0%	2	0%	12	1.5%	98%	100%	83.4%	0%	17					
	levemente distinguível ou reduzido	47.6%	80	100%	2	100%	12	98.5%	132	2%	98	0%	17					
Escamas pós escudos gulares proximais quilhadas?	lisas	81.6%	76	100%	2	100%	6	85.3%	129	9.2%	87	80%	15	83.3%	24	0%	5	
	lev. quilhadas	14.5%		0%		0%		10.9%		14.9%		20%		16.7%		60%		
	quilhadas	3.9%		0%		0%		3.9%		75.9%		0%		0%		40%		
Escamas pós escudos gulares distais quilhadas?	lisas	9.1%	33	-	0	-	0	35.4%	48	1.3%	79	23.1%	13	21.4%	14	0%	5	
	lev. quilhadas	78.8%		-		-		50%		8.9%		76.9%		35.7%		40%		
	quilhadas	12.1%		-		-		14.6%		89.9%		0%		42.9%		60%		
Escamas entre as supraoculares e supraciliares?	sim	8.4%	95	0%	2	91.7%	12	100%	132	1%	102	0%	17	56%	25	23.5%	17	
	não	91.6%		100%		8.3%		0%		99%		100%		44%		76.5%		
Se sim para var.22, quantas escamas na direita	0	62.5%	8	-	0	0%	11	0%	132	100%	1	-	0	30.8%	13	0%	2	
	1	37.5%		-		0%		26.5%		0%		69.2%		100%				
	2	0%		-		72.7%		70.5%		-		0%		0%		0%		
	3	0%		-		27.3%		3%		-		0%		0%		0%		
Se sim para var.22, quantas escamas na direita	0	12.5%	8	-	0	0%	11	0%	131	0%	1	-	0	14.3%	14	0%	2	
	1	87.5%		-		9.1%		40.5%		0%		-		71.4%		0%		
	2	0%		-		63.6%		57.3%		0%		-		14.3%		100%		
	3	0%		-		27.3%		2.3%		0%		-		0%		0%		
	5	0%		-		0%		0%		100%		-		0%		0%		
Se sim para var.22, quais lados apresentam escamas?	só o direito	12.5%	8	-	0	0%	11	0.8%	132	0%	1	-	0	14.3%	14	0%	2	
	direito e esquerdo	25%		-		100%		99.2%		0%		-		50%		100%		
	só o esquerdo	62.5%		-		0%		0%		100%		-		35.7%		0%		
Se sim para var.22, qual a forma das escamas?	alongada	0%	8	-	0	45.5%	11	99.2%	130	0%	1	-	0	0%	14	-	0	
	media	0%		-		0%		0%		0%		21.4%		-				
	pequena	100%		-		54.5%		0.8%		100%		-		78.6%		-		
Internasal dividida?	sim	0%	80	0%	2	0%	12	0%	132	0%	97	0%	17	0%	25	100%	17	
	não	100%		100%		100%		100%		100%		100%		100%		0%		
Parietais estriadas?	sim	59.4%	32	-	0	-	0	95.7%	47	100%	75	76.9%	13	100%	14	100%	5	
	levemente	40.6%		-		-		4.3%		0%		23.1%		0%				
Interparietal estriada?	sim	59.4%	32	-	0	-	0	85.1%	47	100%	75	90.9%	11	100%	14	100%	5	
	levemente	40.6%		-		-		14.9%		0%		9.1%		0%				
Frontoparietais estriadas?	sim	56.3%	32	-	0	-	0	76.6%	47	100%	75	70%	10	85.7%	14	100%	5	
	levemente	40.6%		-		-		23.4%		0%		30%		14.3%		0%		
	não	3.1%		-		-		0%		0%		0%		0%		0%		
Frontal estriada?	sim	46.9%	32	-	0	-	0	27.1%	48	100%	75	70%	10	50%	14	100%	5	
	levemente	40.6%		-		-		72.9%		0%		30%		42.9%		0%		
	não	12.5%		-		-		0%		0%		0%		7.1%		0%		
Prefrontal estriada?	sim	28.1%	32	-	0	-	0	2.1%	48	97.3%	75	60%	10	21.4%	14	100%	5	
	levemente	56.3%		-		-		97.9%		48		2.7%		40%		71.4%		0%
	não	15.6%		-		-		0%		0%		0%		7.1%		0%		
Internasal estriada?	sim	3.1%	32	-	0	-	0	0%	48	58.7%	75	0%	10	14.3%	14	100%	5	
	levemente	65.6%		-		-		100%		48		41.3%		90%		78.6%		0%
	não	31.3%		-		-		0%		0%		0%		10%		7.1%		0%
Razão entre sutura das prefrontais e frontoparietais	Prefrontais maior (>1)	65%	60	0%	1	71.4%	7	20.5%	78	29.7%	37	0%	2	35.3%	17	-	0	
	igual (=1)	13.3%		0%		-		16.7%		21.6%		0%		5.9%		-		
	Frontoparietais maior (<1)	21.7%		100%		28.5%		62.8%		48.6%		100%		58.8%		-		
Bordas interparietal	divergente	100%	76	100%	1	100%	7	91.3%	127	65.2%	92	100%	15	74%	23	40%	5	
	paralela	0%		0%		-		8.7%		34.8%		0%		26%		40%		
	concava	0%		0%		-		0%		0%		0%		0%		20%		
Razão comprimento/largura da interparietal	mais larga que comprida	28.8%	59	0%	1	-	7	20.3%	79	5.4%	37	0%	2	12.5%	16	-	0	
	igual	22%		0%		-		16.5%		2.7%		0%		12.5%		-		
	mais comprida que larga	49.2%		100%		100%		63.3%		91.9%		100%		75%		-		
Faixa mediodorsal	sim	46.1%	76	0%	1	0%	5	0%	130	5.3%	75	0%	8	0%	25	0%	4	
	pontuada	3.9%		0%		0%		0%		80%		0%		0%		0%		
	não	50%		100%		100%		100%		14.7%		100%		100%		100%		
Faixa lateral	sim	3.1%	32	-	1	-	0	0%	48	100%	71	60%	5	100%	14	100%	5	
	parcial	93.8%		100%		-		97.9%		0%		40%		0%		0%		
	não	3.1%		-		-		2.1%		0%		0%		0%		0%		

Variavel	Categorias	<i>L. guianense</i>	<i>L. caparensis</i>	<i>L. hexalepis</i>	<i>L. osvaldoi</i>	<i>L. parietale</i>	<i>L. rugiceps</i>	<i>L. snethlageae</i>	<i>L. southi</i>								
Manchas nos escudos gulares	sim	80%	95	100%	1	100%	7	98.5%	130	86.9%	137	93.3%	15	100%	25	60%	5
	não	20%		0%		0%		1.5%		13.1%		6.7%		0%		40%	
Manchas sinfiscal	sim	36.8%	76	100%	1	100%	7	87.5%	128	21.7%	120	7.1%	14	88%	25	33.3%	3
	não	63.2%		0%		0%		12.5%		78.3%		92.9%		12%		66.7%	
Manchas no 1o escudo	sim	14.5%	76	100%	1	100%	7	82.8%	128	33.3%	120	21.4%	14	80%	25	66.7%	3
	não	85.5%		0%		0%		17.2%		66.7%		78.6%		20%		33.3%	
Manchas no 2o escudo	sim	90.8%	76	100%	1	100%	7	98.4%	128	79.2%	120	100%	14	100%	25	100%	3
	não	9.2%		0%		0%		1.6%		20.8%		0%		0%		0%	
Manchas no 3o escudo	sim	93.4%	76	100%	1	100%	7	83.6%	128	94.2%	120	92.9%	14	60%	25	66.7%	3
	não	6.6%		0%		0%		16.4%		5.8%		7.1%		40%		33.3%	
Manchas no 4o escudo	sim	22.4%	76	100%	1	100%	7	39.1%	128	45.8%	120	35.7%	14	16%	25	33.3%	3
	não	77.6%		0%		0%		60.9%		54.2%		64.3%		84%		66.7%	
Intensidade das manchas nos escudos	bastante / medio	9.4%	75	0%	1	100%	7	29%	128	25.8%	120	14.2%	14	48%	25	0%	3
	pouco / muito pouco	90.7%		100%		0%		71.1%		74.2%		85.7%		52%		100%	

**Tabela 4.** Tempos de divergência estimados (em milhões de anos) entre os principais clados de Gymnophthalmoidea recuperados nas análises de Inferência Bayesiana calibrada com fósseis (IBF) realizadas para os genes NT3 e CYTB.

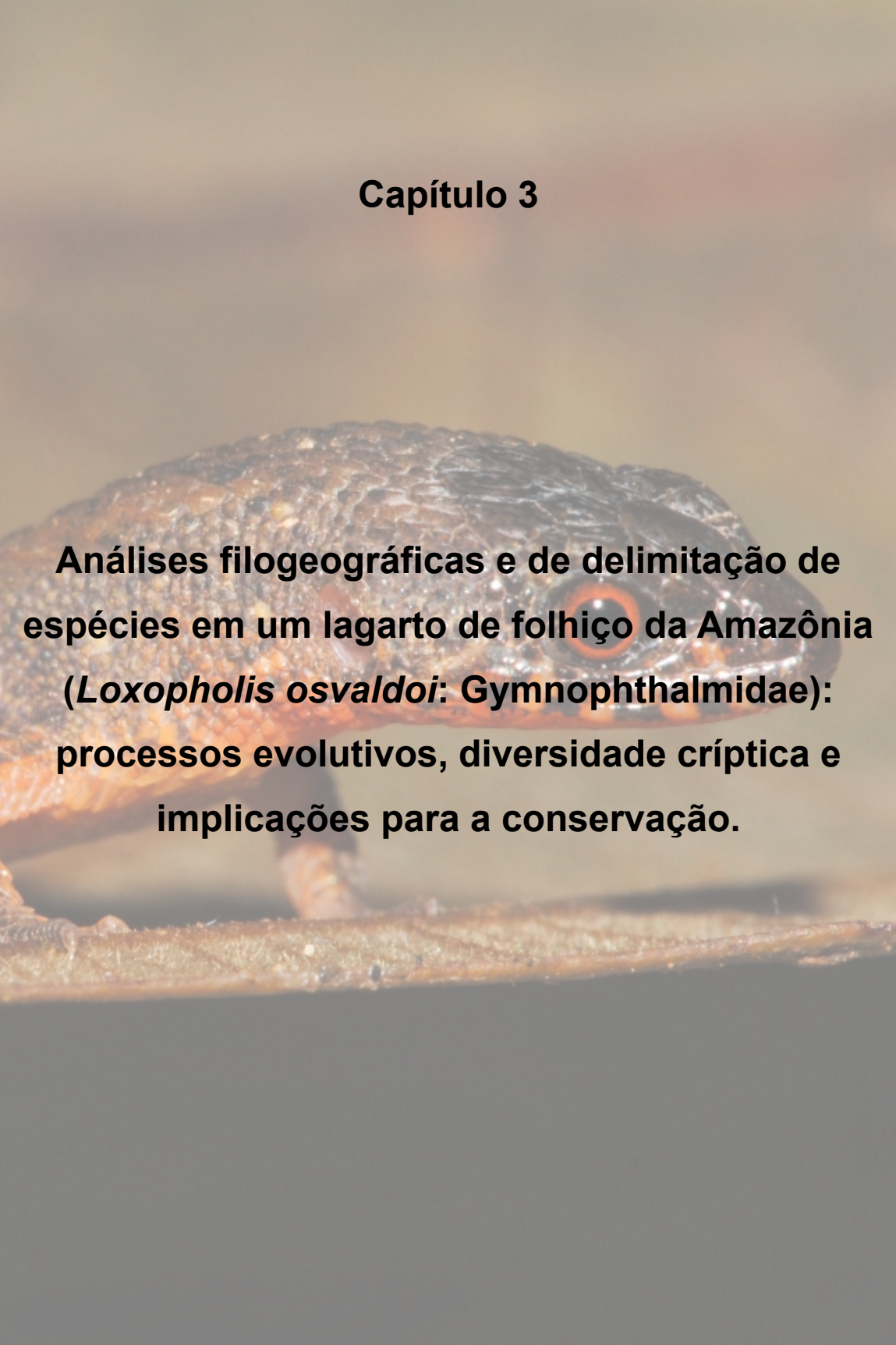
Nó	NT3		CYTB	
	mediana	95% HPD	mediana	95% HPD
Quebra Alopoglossidae- Gymnophthalmidae	110,9	117,9-98,14	-	-
Quebra Gymnophthalminae- Cercosaurinae	96,39	109,5-80,2	81,4	107,1-58,6
Quebra Cercosaurini- Eupleopodini	86,5	101,9-69,41	74,07	98,1-53,0

**Tabela 5.** Tempos de divergência estimados (em milhões de anos) entre os principais clados de *Loxopholis* recuperados nas análises de Inferência Bayesiana com Taxas (IBT).

<b>Evento</b>	<b>mediana</b>	<b>95% HPD</b>
Início da diversificação de <i>Loxopholis</i>	28,3	35,2 – 22,1
Separação do clado <i>L. guianense</i> + <i>L. osvaldoi</i> / <i>L. percarinatum</i> + <i>L. ferreirai</i> + <i>L. hexalepis</i>	24,2	30,2 – 18,9
Especiação entre <i>L. guianense</i> e <i>L. osvaldoi</i>	20,5	25,7 - 16,0
Separação de <i>L. hexalepis</i> do clado <i>L. percarinatum</i> + <i>L. ferreirai</i>	19,8	24,8 – 15,2
Especiação entre <i>L. percarinatum</i> e <i>L. ferreirai</i>	14,4	18,6 – 10,9
Especiação entre <i>L. parietalis</i> e <i>L. snethlageae</i>	21,4	27,2 – 16,4
Início da diversificação intraespecífica em <i>L. parietalis</i>	10,9	14,4 – 7,8
Início da diversificação intraespecífica em <i>L. snethlageae</i>	7,68	10,7 – 5,2
Início da diversificação intraespecífica em <i>L. rugiceps</i>	6,7	9,3 – 4,7
Início da diversificação intraespecífica em <i>L. guianense</i>	6,23	7,6 – 4,1
Separação entre linhagem Sucre e Am. Central em <i>L. rugiceps</i>	4,88	6,8 – 3,14

## Capítulo 3

**Análises filogeográficas e de delimitação de espécies em um lagarto de folhiço da Amazônia (*Loxopholis osvaldoi*: Gymnophthalmidae): processos evolutivos, diversidade críptica e implicações para a conservação.**



## **Resumo**

Complexos de espécies crípticas são caracterizados por organismos que possuem uma grande divergência genética entre si, mas são fenotipicamente indistintos, sendo portanto, classificados sob um mesmo epíteto específico. Diversos processos evolutivos podem resultar em complexos de espécies crípticas, e seu estudo possui importantes implicações para o conhecimento, conservação e bioprospecção da biodiversidade, além de fornecer evidências sobre os processos evolutivos atuando ao nível de espécie e em tempos recentes. Diversos complexos de espécies crípticas têm sido detectados na Amazônia, no entanto, a ausência de uma amostragem adequada limita grandemente o poder de inferências sobre a história evolutiva dos taxons. Nesse capítulo, realizamos um estudo filogeográfico do lagarto *Loxopholis osvaldoi* a partir de uma densa amostragem, revelando uma profunda divergência genética intraespecífica, com linhagens apresentando distribuições parapátricas, não estando delimitadas por barreiras óbvias, como os rios Madeira ou Tapajós, e sendo mantidas parcialmente por isolamento por distância. No entanto, a grande estruturação genética não é correspondida pela variação morfológica, que apresenta uma grande sobreposição entre organismos de linhagens distintas. Análises de delimitação de espécies mostram que *L. osvaldoi* pode conter de 8 a 14 espécies distintas, número esse que praticamente dobra a diversidade conhecida do gênero. Finalmente, discutimos as implicações da diversidade críptica revelada para a conservação de lagartos amazônicos.

## **Abstract**

Cryptic species complexes are defined by groups of lineages with strong genetic divergence among them but that are phenotypically indistinct, therefore being classified under the same specific epithet. A myriad of evolutionary processes can result in cryptic species complexes, and their study has important implications for the knowledge, conservation, and prospecting of biodiversity. Such complexes are also instrumental in our understanding of the evolutionary process acting at the species level. Several cryptic

species complex are being detected in the Amazon, however, the lack of adequate sampling hampers efforts to explain their evolutionary history. In this chapter, we performed a phylogeographic study of the lizard *Loxopholis osvaldoi* with dense geographic sampling. We found deep intraspecific genetic divergences, partially maintained by isolation-by-distance. Interestingly, the limits between divergent and parapatric lineages were not coincident with hypothesized barriers such as the Madeira and Tapajós rivers. Moreover, the deep genetic structure is not coupled with morphological variation, because there is great overlap in morphological space among specimens from distinct lineages. Species delimitation analyses shows that *L. osvaldoi* may comprise 8–14 species, numbers that virtually double the known diversity of *Loxopholis*. Finally, we discuss the implications of the revealed cryptic diversity for the conservation of Amazon lizards.

### **3.1. Introdução**

O complexo arsenal teórico e metodológico desenvolvido desde a fundação da filogeografia (AVISE *et al.*, 1987) teve um impacto enorme na sistemática e taxonomia ao nível de espécies. Em relação a sistemática, duas mudanças de paradigma que aumentaram consideravelmente o poder das inferências filogenéticas foi o desenvolvimento das análises coalescentes, que acomodaram as discordâncias entre genealogias oriundas de múltiplos *loci* independentes via o sorteio incompleto de linhagens (BEERLI & FELSENSTEIN, 2001; HELED & DRUMMOND, 2010; O’MEARA *et al.*, 2015; THOMÉ & CARSTENS, 2016), e o aumento no rigor estatístico no teste de hipóteses demográficas históricas alcançado pelo desenvolvimento da filogeografia estatística (KNOWLES & MADDISON, 2002; KNOWLES, 2009; HICKERSON *et al.*, 2010). Combinados, estes dois avanços permitiram um melhor entendimento do processo evolutivo ao nível de espécies, clarificando os papéis das mudanças geológicas, geomorfológicas e ambientais na formação e manutenção da diversidade biológica (e.g. CARNAVAL *et al.*, 2009; CARNAVAL *et al.*, 2014; PRATES *et al.*, 2016; THOMÉ & CARSTENS, 2016). Em relação a taxonomia, a revolução molecular forneceu o arcabouço teórico e metodológico (e.g. (YANG & RANNALA, 2010; CARSTENS *et al.*, 2013) para lidar com questões difíceis historicamente envolvidas

com a delimitação de espécies (MAYDEN, 1997; DE QUEIROZ, 2007), como a intensidade de fluxo gênico, grau de independência evolutiva e tempo de divergência entre as supostas espécies (PETIT & EXCOFFIER, 2009; PADIAL *et al.*, 2010).

Com o atual enfoque e amplas possibilidades das análises baseadas em dados moleculares, não é surpresa que pouca atenção tenha sido dada para a variação fenotípica da maioria dos grupos focais em estudos filogeográficos. No entanto, a seleção natural atua em última instância sobre caracteres fenotípicos e ecológicos, como a resiliência as alterações ambientais, tolerância fisiológica e capacidade de dispersão, características essas que estão diretamente relacionadas com os padrões filogeográficos detectados (PAPADOPOULOU & KNOWLES, 2016; ZAMUDIO *et al.*, 2016). Essa constatação levou a uma maior integração entre os componentes genéticos e fenotípicos usados para explicar os padrões observados, formalmente definida como *trait-based phylogeography*. Essa abordagem permite clarificar o conhecimento sobre as causas das discordâncias genealógicas e geográficas entre organismos co-ocorrentes (PAZ *et al.*, 2015).

Em relação a taxonomia e delimitação de espécies, a análise da congruência entre a estruturação genética e a variação fenotípica é um componente importante durante a tomada de decisões taxonômicas (PADIAL *et al.*, 2010); não obstante, diversos resultados podem surgir durante uma análise de congruência entre genética e fenótipo (ver ZAMUDIO *et al.*, 2016). Na teoria, é esperado que, quanto maior for o isolamento reprodutivo entre duas linhagens, maior é a chance para as linhagens acumularem diferenças fenotípicas devido a seleção natural ou deriva genética (GOULD & JOHNSTON, 1972). No entanto, diversos estudos filogeográficos empíricos com lagartos e outros organismos mostram que caracteres fenotípicos podem ser extremamente conservados, apesar da presença de grande estrutura genética e longo tempo de isolamento reprodutivo entre linhagens “intraespecíficas” (e.g. WERNECK *et al.*, 2012; MORITZ *et al.*, 2016), originando assim complexos de espécies crípticas. O estudo e delimitação dos complexos de espécies crípticas possuem importantes implicações para o conhecimento, conservação e bioprospecção da biodiversidade, especialmente nos trópicos mega-diversos (BICKFORD *et al.*, 2007).



Entre os biomas sul-americanos, a Amazônia se destaca não apenas por suas enormes proporções e excepcional biodiversidade (MITTERMEIER *et al.*, 2005), mas também pela recente descrição de complexos de espécies crípticas em diversos grupos faunísticos (e.g. GEURGAS & RODRIGUES, 2010; SIMÕES *et al.*, 2010; MIRALLES & CARRANZA, 2010; NUNES *et al.*, 2012; FOUQUET *et al.*, 2012; 2014; 2016; FERNANDES, 2013; KAEFER *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2016). No entanto, dificuldades logísticas limitam a realização de amostragens significativas para a maioria de estudos filogeográficos, dificultando o entendimento de questões relativas a taxonomia, distribuição e relações evolutivas entre as espécies crípticas na Amazônia. Isso é particularmente problemático considerando que a origem e manutenção da atual diversidade amazônica é um assunto controverso (HAFFER, 1969; GASCON *et al.*, 2000; RIBAS *et al.*, 2011; LEITE & ROGERS, 2013) e que os mecanismos evolutivos envolvidos na diversificação de grupos proximamente relacionados são múltiplos e complexos (RULL, 2011).

Neste capítulo, investigamos os padrões de estrutura genética no lagarto de folhço *Loxopholis osvaldoi* (Squamata: Gymnophthalmidae) a partir de uma amostragem densa que cobre praticamente toda a distribuição da espécie, que também foi atualizada aqui. Uma boa cobertura de localidades e amostras são raras em estudos filogeográficos na Amazônia, e evidências obtidas a partir de escalas finas representam boas oportunidades para estudar o papel controverso e posição geográfica de antigas barreiras vicariantes na Amazônia, como arcos tectônicos, rios atuais e passados, assim como habitats inóspitos (i.e. expansão de habitats abertos durante o Pleistoceno). Apesar disso, aqui focaremos no resultado do processo evolutivo em *L. osvaldoi* ao invés do processo *per se*, investigando a delimitação de espécies da diversidade críptica e sua distribuição geográfica. Adicionalmente, medimos a variação morfológica dos espécimes ao longo da distribuição geográfica e examinamos a convergência entre os dados genéticos e morfológicos, fornecendo *insights* nas causas da divergência entre essas duas fontes de dados baseadas em características ecológicas e de história natural da espécie.

### **3.2. Material e métodos**

### **3.2.1. Amostragem**

Nós apresentamos o mais completo e acurado mapa de distribuição de *L. osvaldoi* até o momento. Nós compilamos também uma base de dados sobre a ocorrência da espécie contendo 79 localidades, das quais 93% (74) foram confirmadas por dados morfológicos, genéticos, ou ambos (Figura 1). *L. osvaldoi* está distribuído na amazônia Central, principalmente ao sul do Rio Amazonas, nas bacias do Rio Purus, Madeira e Tapajós. No entanto, também existem populações ao norte do Rio Amazonas, próximas das cidades de Manaus e Presidente Figueiredo. Diversas localidades estudadas estão situadas em margens imediatamente opostas de vários rios ao longo da distribuição. Essa disposição espacial oferece uma boa oportunidade para estudar a influência dos rios na variação morfológica e/ou molecular, já que ela minimiza a distância geográfica entre as amostras, ao mesmo tempo maximizando a detecção de um potencial efeito do rio nas variáveis estudadas (e.g. FERNANDES *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2013).

Nossa base de dados morfológicos consiste de 184 espécimes analisados de 60 localidades (Apêndice 4). Para 143 destes, incluindo a série tipo, coletamos 20 variáveis merísticas, 45 categóricas e 16 morfométricas para cada espécime, dados que foram usados na análise da variação geográfica fenotípica e para testar a correlação entre dados morfológicos e moleculares. Os dados morfológicos estão explicados no Apêndice 3. Os 41 espécimes remanescentes tiveram sua identificação confirmada por análise visual e contagens de escamas. Já o banco de dados molecular conta com 159 amostras de tecido de 49 localidades da Amazônia Central, que cobrem praticamente toda a distribuição da espécie (Figura 1, Tabelas 1 e 2). A amostra de tecidos foi levantada durante diversas expedições feitas pelos autores (SMS e MTR) desde 1997, assim como através de parcerias com as instituições: Coleção de Zoologia Paulo Bürrnheim da Universidade Federal do Amazonas (CZPB/UFAM), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA-Manaus), Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT), Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG – Belém), Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP) e Louisiana State University (LSU-USA).

### **3.2.2. Procedimentos laboratoriais e edição de sequências**

O DNA foi extraído de amostras de tecido (musculo ou fígado) conservados em etanol 100%. Foram sequenciados quatro *loci*, sendo 2 mitocondriais e 2 nucleares, usando o sequenciamento Sanger tradicional. Do genoma mitocondrial (mtDNA), sequenciamos um fragmento de 670 pares de bases (pb) do gene NADH dehidrogenase da subunidade 4 (ND4) e um fragmento de 415 pb do gene Cytocromo *b* (CTYB). Do genoma nuclear, foram sequenciados 2 fragmentos de genes codificantes, um fragmento de 647 pb do gene Neurotrofina-3 (NT3) e um fragmento de 617 pb do gene para USF3 (KIAA2018). Os primers utilizados e os protocolos de PCR estão listados no apêndice 2. Após a amplificação, os produtos de PCR foram purificados com Exonuclease I e Alkaline Phosphatase (protocolo ExoSap). O sequenciamento foi realizado utilizando o kit BigDye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems), seguido pela análise no sequenciador ABI Prism 310, 3700 ou 3170 Genetic Analyzer Sequencers (Applied Biosystems). As sequências resultantes foram combinadas e editadas usando o programa Geneious v.6.1.8. (Biomatters Ltd.). Após a edição das sequências, todas foram checadas para contaminação usando o algoritmo BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Para os genes nucleares, as posições nucleotídicas polimórficas dos indivíduos heterozigotos foram codificadas de acordo com o código IUPAC de ambiguidades. O haplótipo faseado mais provável das sequências heterozigotas foi inferido utilizando o algoritmo bayesiano PHASE, assim como implementado no programa DnaSP v.5.10.01. (LIBRADO & ROZAS, 2009). Todos os haplótipos foram incorporados para inferências haplotípicas. Os alinhamentos foram gerados usando o algoritmo ClustalW como implementado no Geneious, utilizando os parâmetros *default*. Os alinhamentos foram examinados visualmente e checados para a presença de codons de parada traduzindo os nucleotídeos para sequências de aminoácidos.

Estatísticas demográficas básicas foram geradas para cada marcador usando o DnaSP (Tabela 3). Nós também calculamos o número de haplótipos nucleares e a porcentagem de haplótipos compartilhados por localidade (Tabela 1). Espera-se que o número de haplótipos por localidade esteja diretamente relacionado com o número de amostras da localidade. Para corrigir esse desvio, calculamos um “índice de diversidade

haplotípica corrigido” por localidade. Esse índice consiste dos resíduos de uma regressão linear entre número de haplótipos e número de amostras por localidade (Tabela 1). Distâncias genéticas par a par ( $p$ -distance) entre as amostras foram calculadas para os marcadores mitocondriais usando a função `dist.dna()` do pacote “ape” no R v.3.1.2. As distâncias genéticas foram corrigidas para diferentes probabilidades entre transição e transversão usando o modelo de substituição K2P (ou K80). Também calculamos a distância genética média entre os nós da árvore de mtDNA (Figura 3). A distância entre dois clados é representada pela distância média par a par entre cada terminal dos dois clados em questão.

### **3.2.3. Análises filogenéticas e genealogias de haplótipos**

Nós usamos o critério de otimização da máxima probabilidade posterior (análises Bayesianas) para fazer as inferências filogenéticas. Árvores filogenéticas foram estimadas para cada gene separadamente. Também usamos 3 esquemas de concatenação das partições: apenas os genes mitocondriais concatenados, apenas genes nucleares, e o *dataset* completo (mitocondrias e nucleares concatenados).

As árvores foram enraizadas usando sequências do alopoglossideo *Alopoglossus*, recorrentemente recuperado como basal em relação a todos os outros gimnoftalmídeos (PELLEGRINO *et al.*, 2001; GOICOCHEA *et al.*, 2016). Análises filogenéticas bayesianas foram rodadas no software MrBayes v.3.2. (RONQUIST *et al.*, 2012). Os modelos de substituição de DNA, assim como o melhor esquema de partição, foram inferidos utilizando o software PartitionFinder v.1.1.1 (LANFEAR *et al.*, 2012) através do Critério de Informação Bayesiano (BIC). Para cada análise (árvore de genes e matrizes concatenadas) foram realizadas duas corridas independentes, cada uma com quatro Cadeias de Markov via Monte Carlo (MCMC), iniciando com um *seed* randômico. Cada corrida consistiu de 10.000.000 de iterações amostradas a cada 1.000 iterações. A convergência entre as cadeias e os valores de ESS (effective sample size) foram checados no Tracer v.1.6., e apenas valores de ESS maiores que 200 foram considerados como uma amostragem satisfatória dos parâmetros. A árvore de Máxima Probabilidade Posterior (MAP) e os valores de Probabilidade Posterior (PP) para cada nó foram calculados após considerar um valor conservativo de *burn-in* (25%). Nós

foram considerados como bem suportados apenas quando assumiram valores de PP igual ou maior que 95%.

As árvores Bayesianas concatenadas nucleares apresentaram no geral uma baixa resolução, com valores baixos de PP para a maioria dos nós. Sendo assim, utilizamos de outras abordagens para investigar a estruturação genética presente no *dataset* nuclear. Primeiro, construímos um novo *dataset* a partir de um subconjunto do *dataset* nuclear, de forma que contivesse apenas amostras sequenciadas com sucesso para todos os dois marcadores nucleares. Esse novo *dataset* se constituiu de 108 amostras, e esse novo dataset foi utilizado nas análises que foram rodadas apenas os dados nucleares. O compartilhamento de haplótipos dos genes nucleares foi explorado através de genealogias de haplótipos, analisadas em uma versão beta do programa Haploviewer (<http://www.cibiv.at/~greg/haploviewer>), seguindo os procedimentos detalhados em SALZBURGER e col. (2011). As genealogias dos haplótipos foram construídas a partir de uma árvore de input construída a partir de uma análise de *Neighbour Joining* (NJ) inferida no software MEGA v.7.0.14 (KUMAR *et al.*, 2001). Posteriormente, os haplótipos foram classificados de acordo com os grupos recuperados na árvore de mtDNA.

#### **3.2.4. Árvore de espécies**

Rodamos também uma inferência *multilocus* da árvore de espécies, que leva em conta as possíveis divergências entre as genealogias dos marcadores utilizados em um contexto coalescente. A árvore de espécies foi rodada a partir do algoritmo \*BEAST como implementado no programa BEAST v.1.8.1. (HELED & DRUMMOND, 2010). As amostras foram classificadas de acordo com os grupos recuperados na árvore de mtDNA (Figura 3). Utilizamos o programa BEAUti v.1.8.1. para construir os arquivos .xml, input do BEAST. Os priors da árvore de espécies foram setados como *Yule process* e o modelo de tamanho de população ancestral foram setados como *piecewise linear & constant root*. Os modelos de substituição nucleotídica foram simplificados em relação as análises no MrBayes para evitar a superparametrização do modelo. Para estimar os tempos de divergência a partir do Ancestral Comum Mais Recente (MRCA) de cada nó, nós usamos um modelo de relógio restrito, onde o *prior* clock.rate foi

estimado para cada partição. O *prior* clock.rate para os genes ND4 e KIAA2018 foram setados como não-informativos, assumindo uma distribuição gamma com os parâmetros *shape*=0,001 e *scale*=1.000, de acordo com as informações fornecidas pelos autores do BEAST no *website* do programa. No entanto, nós estimamos a taxa de substituição nucleotídica para os genes CYTB e NT3 a partir da análise calibrada com fósseis para a família Gymnophthalmidae (análise IBF – ver Capítulo 2). Sendo assim, a taxa de substituição nucleotídica utilizada para o CYTB foi de 0,0113 substituições/sítio/milhão de anos (1,7E-4 de desvio padrão), implementada a partir de uma distribuição normal. Essa taxa é ligeiramente menor, porém parcialmente concorda com estimativas prévias utilizadas para genes mitocondriais em lagartos (PELLEGRINO *et al.*, 2011; WERNECK *et al.*, 2015). Por sua vez, um prior de distribuição normal também foi utilizado para o gene nuclear NT3, com uma taxa de substituição nucleotídica de 9,0E-4 substituições/sítio/milhão de anos (1,0E-5 de desvio padrão). essa foi a primeira vez (até onde sabemos) que a taxa desse gene foi estimada na literatura. Nós rodamos duas MCMC com 50.000.000 iterações cada, amostradas a cada 1.000 iterações, totalizando 100.000 iterações quando os arquivos .log foram combinados no programa LogCombiner v.1.8.1. Novamente, a convergência entre os parâmetros do modelo e os valores de ESS foram checados no Tracer v.1.6. e a árvore de Máxima Credibilidade de Clados (MCC) foi gerada no TreeAnnotator após um valor de 10% de *burn-in*. Todas as árvores foram visualizadas e editadas no FigTree v.1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>) e no programa InkScape v.0.9.1.

### **3.2.5. Isolamento por distância**

Dado o pequeno tamanho corporal de *L. osvaldoi*, investigamos também se o isolamento por distância (IPD) pode exercer um papel importante nos padrões geográficos de estruturação genética. Nós utilizamos testes de Mantel (MANTEL, 1967) para investigar a correlação entre a distância geográfica e as distâncias filogenéticas entre as amostras. Distâncias filogenéticas par a par foram representadas pela soma dos comprimentos de ramos entre duas determinadas amostras na árvore de mtDNA. As análises foram rodadas internamente para cinco grupos recuperados na árvore de mtDNA (denominados Am, Em, Gm, Hm, Im – ver seção Resultados) que possuem

ampla distribuição geográfica e tamanho amostral suficientemente grande. Adicionalmente, também rodamos a análise de Mantel para o *dataset* completo. Para evitar um grande número de valores 0 (i.e. amostras da mesma localidade) na matriz de distâncias geográficas x filogenéticas (que poderia levar a uma superestimação do valor do Índice de Correlação de Pearson), amostras de uma mesma localidade e do mesmo subclado foram excluídas da árvore de mtDNA usando a função `drop.tip()` do pacote “ape” no ambiente R. Os testes de Mantel foram rodados no R através da função `distfilogeo()`, desenvolvida no âmbito desta tese, e que pode ser visualizada no apêndice 5. basicamente, a função calcula a distância geográfica par a par de um input com todas as amostras e suas respectivas coordenadas geográficas. Posteriormente a função calcula a distância filogenética par a par para todos os terminais de uma árvore filogenética, e calcula o Índice de Correlação de Pearson entre as duas matrizes de distâncias. O teste de significância é calculado a partir de  $n$  randomizações da matriz de distâncias geográficas e a comparação entre os valores do índices de correlação aleatórios (hipótese nula) e o valor observado.

### **3.2.6. Delimitação de espécies**

Em adição as análises filogenéticas, nós também estimamos os diferentes cenários relativos a delimitação de espécies em *L. osvaldoi* usando abordagens diferentes, não filogenéticas. Primeiramente, atribuímos as amostras à grupos genéticos utilizando evidências relativas a frequência alélica dos dados nucleares usando o algoritmo STRUCTURE (PRITCHARD *et al.*, 2000). Também rodamos uma análise de delimitação Bayesiana coalescente utilizando o software BPP (Bayesian Phylogenetics and Phylogeography – YANG & RANNALA, 2010), que atribuí valores de probabilidade posterior para quebras entre diferentes espécies em potencial (i.e. nós) em uma árvore-guia fornecida pelo usuário. Por fim, investigamos os grupos genéticos com os dados dos genes nucleares usando uma *multilocus network* baseada em distâncias genéticas no programa POFAD (JOLY & BRUNEAU, 2006). Os detalhes dessas análises são descritos abaixo.

#### **3.2.6.1. STRUCTURE**

O algoritmo Bayesiano implementado no STRUCTURE v.2.3.4. usa a informação das freqüências alélicas para classificar as amostras em diferentes grupos genéticos, atribuindo valores de probabilidade posterior para a atribuição a determinado grupo para cada amostra. A matriz de *input* foi construída a partir dos alinhamentos dos genes nucleares usando o programa xmf2struct (<http://www.xavierdidelot.xtreemhost.com>). O valor de K (número de clusters) testados variou de 1 a 15, com 4 réplicas de MCMC para cada valor de K. A duração do período de *burn-in* para cada réplica foi de 100.000 iterações e o número de interações após o burn-in foi de 250.000. De acordo com o manual do Structure, utilizamos um modelo de ancestralidade que considera a possibilidade de hibridização entre as populações (admixture model). Após as análises, os dados foram analisados no Structure Harvester (<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>), que implementa o método de EVANNO e col. (2005) para calcular o  $\Delta K$  (segunda ordem da taxa de mudança de L(K)) e assim inferir o número de clusters nos dados. Após determinar o melhor valor de K, a classificação dos indivíduos nos clusters referente ao melhor valor de K foi sumarizada no CLUMPP v.1.1.2 através de uma busca exata (M=1) e pesada pelo número de indivíduos em cada população (W=1). Os gráficos determinando a probabilidade posterior de cada amostra para a classificação em um determinado grupo foi realizado usando o site Structure Plot (<http://btismysore.in/strplot/>).

Todas as árvores de genes, árvores concatenadas (MrBayes) ou baseadas na coalescência (árvore de espécies) forneceram evidências fortes de profunda estruturação genética e tempos de divergência em *L. osvaldoi*, indicando a presença de 3 clados basais na espécie (ver seção Resultados). Sendo assim, a primeira rodada de classificações de amostras no STRUCTURE resultou em um valor ótimo de  $\Delta K$  de 3, sendo que as classificações são perfeitamente concordantes com os resultados das análises filogenéticas, i.e. os resultados das classificações do STRUCTURE refletem os 3 clados basais das análises filogenéticas (Figura 8). Com isso, rodamos novas análises no STRUCTURE, dessa vez dividindo os dados de acordo com os 3 clados supracitados, e rodando análises independentes para cada cada subconjunto. A configuração dos parâmetros da segunda rodada de análises foram os mesmos das



primeiras. Essa abordagem permitiu a detecção de uma estruturação genética adicional nos dados nucleares, permitindo investigar a concordância entre os clados derivados das análises filogenéticas e a estrutura de segunda ordem detectada com os dados de frequência alélica.

### 3.2.6.2. Bayesian Phylogenetics and Phylogeography (BPP)

Nós implementamos uma delimitação de espécies Bayesiana usando o software BPP, que acomoda discordâncias entre árvores de genes e de espécie devido a polimorfismo ancestral compartilhado ou sorteio incompleto de linhagens, em um contexto coalescente (YANG, 2015). Nessa análise, testamos se os clados derivados recuperados na árvore de mtDNA podem representar possíveis espécies. Nesta análise, usamos apenas o *dataset* nuclear devido a diferença entre os tempos de coalescência entre os genes mitocondriais e nucleares (PALUMBI *et al.*, 2001), que pode influenciar negativamente os resultados da análise (YANG, com.pess.). A análise BPP se baseia em uma *reversible-jump* MCMC (rjMCMC) para estimar a probabilidade posterior dos diferentes modelos de delimitação de espécies. Um passo crítico nessa análise é uma especificação adequada dos *priors* para dois parâmetros populacionais: o tamanho ancestral das populações ( $\theta_s$ ) e os tempos de divergência ( $\tau_s$ ), ambos podendo afetar significativamente a probabilidade posterior dos modelos (LEACHÉ & FUJITA, 2010; YANG, 2015). Ambos os *priors* possuem uma distribuição gamma  $G(\alpha, \beta)$ , sendo  $\alpha$  o parâmetro de forma e  $\beta$  o parâmetro de taxa. A média do prior gamma é dada por  $\alpha/\beta$  and variance  $\alpha/\beta^2$  (YANG, 2015). Seguindo LEACHÉ e FUJITA (2010), avaliamos a influência de diferentes valores desses *priors* nos modelos de delimitação de espécies. Especificamente, usamos três combinações de *priors*: a primeira combinação assumiu um grande tamanho ancestral das populações e divergências profundas ( $\theta_s = \tau_s = G(1,10)$ ); a segunda configuração representa o cenário oposto, com tamanho pequeno das populações ancestrais e divergências rasas ( $\theta_s = \tau_s = G(2,2000)$ ); a terceira combinação é um mistura entre os dois cenários prévios, com grandes tamanhos de população ancestral ( $\theta_s = G(1,10)$ ) e tempos de divergência rasos ( $\tau_s = G(2,2000)$ ).

Outro passo crítico da análise BPP é a necessidade de fornecer uma árvore-guia dicotômica, através da qual o algoritmo irá avaliar os diferentes modelos de delimitação

de espécies, colapsando os nós relativos as potenciais espécies. A entrada de uma árvore mal resolvida pode inflar artificialmente o número de espécies durante a escolha de modelos, já que terminais pouco relacionados tendem a possuir distâncias genéticas grandes, diminuindo assim a probabilidade posterior para o colapso do nó referente as duas espécies, e aumentando a PP daquele evento de especiação (LEACHÉ & FUJITA, 2010). Nós levamos em consideração as incertezas na árvore-guia testando árvores diferentes como input, de modo que essas reflitam as principais incertezas refletidas na árvore mtDNA, árvore nuclear, árvore concatenada e árvore de espécies. Devido a limitações no tempo de processamento de dados, excluimos os grupos Cm, Lm, Mm e Nm, dado o pequeno tamanho amostral destes e os baixos valores de suporte para a posição filogenética dos mesmos. Após essa exclusão, chegamos em 6 árvores-guia diferentes (Figura 10), resultando em 18 corridas do BPP (3 combinações de priors\* 6 árvores-guia). Para cada corrida, rodamos a rjMCMC por 2.000.000 iterações, amostrando a cada 2 iterações, com um valor de *burn-in* de 20.000.

### **3.2.6.3. Filogenia dos organismos por dados alélicos (POFAD)**

O algoritmo POFAD v.1.0.3. (JOLY & BRUNEAU, 2006) combina informação alélica de alelos independentes para construir uma *network* filogenética *multilocus* das amostras baseada em distâncias genéticas. Apenas a informação dos dois marcadores nucleares (NT3 e KIAA2018) foi utilizada nesta análise. As distâncias genéticas par a par (*uncorrected p-distance*) foram calculadas no MEGA. Após a implementação da matriz de distâncias no POFAD, usamos o SplitsTree v.4.14.4. para produzir a *multilocus network* através do método NeighbourNet. Para fazer inferências quanto as relações filogenéticas entre os grupos nucleares recuperados, classificamos os espécimes de acordo com as classificações das amostras obtidas no STRUCTURE.

### **3.2.7. Análises morfológicas**

As análises morfológicas foram rodadas separadamente para machos e fêmeas. Os espécimes foram sexados através da presença de hemipênis evertido (quando disponível) e o número e conspicuidade dos poros na placa pré-cloacal e poros femorais, um dos mais conspícuos dimorfismos sexuais em *Loxopholis* (AVILA-PIRES, 1995; SOUZA *et al.*, 2013). Para evitar a influência da variação alométrica entre juvenis

e adultos nas análises morfométricas, apenas analisamos a morfometria de indivíduos considerados adultos. Esse valor foi estipulado através do valor de comprimento rostro-cloacal do menor macho que apresentou poros bem desenvolvidos, indicando maturidade sexual.

A variação nos caracteres merísticos e morfométricos foi analisada através de uma Análise de Componentes Principais (PCA). As variáveis morfométricas foram corrigidas para o tamanho através de uma regressão linear com o primeiro eixo de uma PCA prévia. A PCA morfométrica final foi então calculada usando os valores dos resíduos das regressões lineares. Utilizamos uma matriz centrada e estandardizada nas PCA's, procedimentos obtidos subtraindo cada valor pelo valor médio da respectiva variável e dividindo os valores centralizados pelo desvio padrão da variável. As PCA's foram rodadas utilizando a função `prcomp()` do pacote "stats" do R. As variáveis morfométricas 'Antebraço' e 'Plantar do pé' obtiveram grande frequência de missing data e foram excluídas das PCA's morfométricas. As variáveis merísticas simétricas (e.g. lamelas do 4º dedo) onde o valor de um dos lados estava faltando foram preenchidas com o mesmo valor da variável do lado oposto do corpo.

### **3.3. Resultados**

#### **3.3.1. Diversidade haplotípica e estatísticas populacionais**

Tanto os marcadores mitocondriais quanto os nucleares mostraram grandes valores de diversidade haplotípica, variando entre 0,98 e 0,99, apontando que os marcadores usados, especialmente os nucleares, possuem boa quantidade de informação para reconstruções filogenéticas e demográficas ao nível taxonômico analisado neste trabalho. Como esperado, no entanto, haplótipos nucleares são menos divergentes entre si do que os mitocondriais: a diversidade nucleotídica dos marcadores nucleares é em média 10 vezes menor. Os testes  $F_u$ 's and  $L_i$ 's resultaram em valores significativos para a estatística  $F^*$  nos marcadores nucleares, porém não nas partições mitocondriais, indicando que os genes NT3 e KIAA2018 apresentam desvios da neutralidade (Tabela 3). Essa diferença de resultados indica que o desvio da neutralidade dos marcadores nucleares não se deu por fenômenos demográficos (e.g. efeito gargalo), e que os marcadores nucleares podem estar sobre um possível efeito

de seleção. Dado que os dois estão envolvidos na codificação de proteínas, essa parece uma hipótese razoável.

O número de haplótipos exclusivos por localidade também é notável. Das 49 localidades amostradas para o NT3, 22 não compartilharam haplótipos deste gene com nenhuma outra localidade. Similarmente, para o KIAA2018, 19 localidades de 42 amostradas apresentam apenas haplótipos únicos (Tabela 1). As genealogias dos haplótipos mostraram que, no geral, localidades que compartilham haplótipos são classificadas nos mesmos grupos mitocondriais, com poucas exceções (discutidas abaixo). A curva de frequência de haplótipos para o dataset completo mostra uma queda rápida, seguida de uma longa cauda de haplótipos únicos (Figura 2).

### **3.3.2. Análises filogenéticas e distâncias genéticas**

Todas as análises filogenéticas e os dados de distâncias genéticas indicam que *L. osvaldoi* possui uma forte e profunda estrutura filogeográfica. Tanto a árvore do gene ND4, árvore de mtDNA e a árvore concatenada (*dataset* completo) são muito similares em sua topologia, estrutura geral e suporte dos nós. Desse modo, apresentamos aqui apenas a árvore de mtDNA (Figura 3), e iremos nos referir apenas a ela para discutir esse resultado. No geral, amostras da mesma localidade são agrupadas em clados monofiléticos na árvore mtDNA, no entanto, existem alguns casos de simpatrias entre integrantes dos grupos mitocondriais, que serão discutidos abaixo. Nós identificamos 13 grupos bem suportados e geograficamente coesos na árvore mtDNA em *L. osvaldoi* (Figura 3). Esses grupos (nomeados como Am – Nm) foram identificados em termos de suporte e coesão geográfica, no entanto, existe ainda uma estrutura filogenética significativa nestes grupos (e.g. Am – Figura 3). Os grupos mtDNA estão aninhados em 3 clados basais, denominados Clado 1 (composto por Am, Bm, Cm, Dm, Em and Fm), Clado 2 (apenas Gm), e Clado 3 (Hm, Im, Jm, Lm, Mm and Nm). Os 3 clados basais são majoritariamente alopátricos, com o clado 1 sendo distribuído a porção nordeste, e os clados 2 e 3 na porção sudoeste da distribuição da espécie. Apesar do grande suporte para os grupos mtDNA, as relações entre eles é controversa (Figuras 3 e 5A). As distâncias genéticas entre os grupos mtDNA é bem alta, variando de ~10% até ~16% entre as linhagens principais.

A árvore do gene CYTB (não representada) recuperou a maioria dos grupos mtDNA detalhados acima, no entanto, o grupo Im está espalhado na árvore do CYTB. Ainda, a árvore do CYTB não recuperou a estrutura basal da árvore mtDNA (clados 1, 2 e 3), e possui, no geral, um suporte baixo para as relações basais entre os grupos. As árvores dos genes nucleares (não representadas) não foram informativas no geral, contendo um grande número de politomias e baixa resolução dos nós. No entanto, a árvore nuclear concatenada recuperou uma estrutura similar comparada a árvore mtDNA (Figuras 5A e C). Alguns grupos mtDNA foram igualmente recuperados na árvore nuclear (e.g. Am e Bm), enquanto outros foram parcialmente congruentes com a estrutura mitocondrial, sendo subdivididos (e.g. Im) ou fundidos (e.g. Em). As linhagens recuperadas na árvore nuclear foram altamente congruentes com os resultados do STRUCTURE (ver abaixo). Sendo assim, baseado nas evidências filogenéticas e de frequência de alelos, reconhecemos 14 grupos nucleares, nomeados de An até On (Figuras 5C, 5D e Figura 8). As relações filogenéticas recuperadas pela árvore nuclear também foi bem similar á árvore mtDNA, em particular em relação a estrutura basal (clados 1, 2 e 3). No entanto, algumas diferenças na estrutura basal podem ser apontadas, em especial em relação a posição filogenética dos grupos centro-leste (Mm e Nm), que aparecem em uma posição basal na árvore mtDNA e aninhadas no interior do clado 3 na árvore nuclear (Figuras 5A e C).

### **3.3.3. Potenciais casos de hibridizações**

Como notado acima, a estrutura genética está fortemente relacionada com a geografia, já que amostras da mesma localidade foram amplamente recuperadas como linhagens monofiléticas na árvore mtDNA. No entanto, em algumas localidades, amostras classificadas em diferentes grupos mtDNA ocorrem em simpatria. Esse é o caso da localidade 31 (Cachoeira das Pombas, com 2 amostras do grupo Fm e 5 de Hm), 44 (Colniza, com 6 em Gm e 4 em Hm) e 45 (Jurena, com 1 em GM e 5 em Hm) (Figura 5B e Tabela 1). Utilizamos informações de genealogias de haplótipos e métodos de atribuição (e.g. STRUCTURE) para investigar se a simpatria entre os grupos mtDNA pode promover a hibridização entre linhagens. Mais especificamente, procuramos por discordâncias entre as evidências mitocondriais e nucleares nos espécimes simpátricos.

Em 44 das 45 localidades, não há evidências de hibridização, já que as partições mitocondriais e nucleares concordam na classificação das amostras. No entanto, na localidade de Cachoeira das Pombas (31), a evidência mitocondrial classifica o espécime MTR 10153 no grupo Fm do clado 1, mas as genealogias haplotípicas indicam uma maior proximidade do genoma nuclear com o grupo Gm (clado 2) (Figura 4A e B). De fato, a análise do STRUCTURE assinala valores de PP similares para os cladros 2 e 3 para o indivíduo MTR 10153, e ainda uma pequena PP para o clado 3 (Figura 8). A *network* POFAAD também posiciona essa amostra entre os cladros 2 e 3 (Figura 9). Coletivamente, esses resultados indicam que o genoma mitocondrial da amostra MTR 10153 é mais proximamente relacionado com os integrantes do clado 1, e o genoma nuclear com o clado 2 ou 3, sugerindo que esse espécime pode ser o resultado de um evento de hibridização entre indivíduos de diferentes cladros basais. Outro indivíduo que possivelmente pode representar um híbrido é MTR 10141, também de Cachoeira das Pombas. No entanto, este indivíduo possui dado faltante para o gene NT3, de forma que foi excluído das análises nucleares.

A distribuição geográfica dos grupos mitocondriais (Figura 5B) e nucleares (5D) é parapátrica em alguns casos, sem que haja barreiras geográficas evidentes separando as distribuições. Esse é o caso, por exemplo, da zona de contato entre os grupos Em (clado 1) e Im (clado 3) (Figura 5B), que está situada no meio do interflúvio entre os rios Madeira e Purus. Esse arranjo espacial oferece uma oportunidade para que ocorrem eventos de hibridização entre linhagens distantes filogeneticamente. De fato, através das genealogias haplotípicas, nós detectamos dois possíveis casos de híbridos, ambos situados na zona de contato citada acima. MTR 18803 é um espécime da localidade Lago Chaviana (SL 19) e está aninhado no grupo Em da árvore mtDNA com outros espécimes da mesma localidade. No entanto, um de seus haplótipos do gene NT3 (é um indivíduo heterozigoto) é compartilhado entre outros membros do grupo Im, mais especificamente com os espécimes MTR 10158 (SL 25) e MTR 19179 (SL 20). O outro haplótipo para este gene é compartilhado com outros indivíduos do grupo Em como esperado. A mesma situação é observada para o espécime VOGT 2156 (SL 21), onde um dos haplótipos do gene NT3 é mais próximo do grupo Im e o outro do grupo Em

(Figura 4A). No entanto, em relação ao gene KIAA2018, ambos os haplótipos de VOGT 2156 são mais próximos do grupo Em como esperado. Infelizmente, não foi possível sequenciar o gene NT3 para o espécime MTR 18803.

#### **3.3.4. Árvore de espécies**

As relações entre os grupos mtDNA recuperadas na árvore de espécies é altamente concordante com as árvores mtDNA e nuclear. Novamente, os clados 1 e 3 foram recuperados com um suporte relativamente alto. Similarmente a árvore mtDNA, o grupo Nm foi recuperado como basal a todas as outras linhagens. A relação próxima de parentesco entre Hm e Im foi recuperada com grande suporte, no entanto, as relações dentro dos clados basais permaneceram largamente não resolvidas na árvore de espécies (Figura 6).

O início da divergência intraespecífica em *L. osvaldoi* foi estimado como tendo ocorrido no Mioceno, entre 11,8 e 7,5 Ma, assim como a divergência entre os 3 clados basais. A diversificação no interior dos clados, mais derivada, ocorreu em grande parte no Plioceno, e apenas a divergência entre Hm e Im foi estimada para o Pleistoceno. No geral, os tempos de divergência mostraram amplos intervalos de confiança (95% highest posterior density) (Figura 6).

#### **3.3.5. Isolamento por distância**

Todos os 5 grupos mtDNA testados para IPD mostraram correlações entre as distâncias geográficas e filogenéticas significantes (Am, Gm, Hm e *dataset* completo) ou marginalmente significantes (Em e Im) (Figura 7). O ajuste ao modelo linear também foi, no geral, moderadamente alto, como indicado pelos valores de R, no entanto, esse valor foi baixo para o grupo Im. Esse resultado reflete a posição de alguns pontos no canto inferior direito do gráfico da Figura 7E, correspondendo as localidades 20, 27, 31, 33, 34, 35 e 36, que possuem grandes distâncias geográficas entre elas (em alguns casos excedendo 600 Km), porém pequenas distâncias filogenéticas. A análise de Mantel para o *dataset* completo também foi altamente significativa, mas o ajuste ao modelo linear foi baixo. Esse resultado é dado pelos pontos na porção superior esquerda do gráfico da Figura 7F, que são geograficamente próximos entre si, porém filogeneticamente distantes na árvore mtDNA.

### **3.3.6. Delimitação de espécies**

#### **3.3.6.1. STRUCTURE**

Como comentado acima, a primeira rodada de análises no STRUCTURE resultou em um valor ótimo de  $\Delta K$  de 3, com as atribuições das amostras concordante com a estrutura basal recuperada nas análises filogenéticas. Esse resultado é, de certa forma, esperado, já que o cálculo da taxa de mudança de segunda ordem dos valores de K (i.e.  $\Delta K$ ) favorece valores pequenos de K, que refletem a estruturação basal do *dataset* (EVANNO *et al.*, 2005). A segunda rodada de análises no STRUCTURE, por sua vez, resultou em valores ótimos de  $\Delta K$  de 4, 2 e 8 para os clados 1, 2 e 3 respectivamente (Figura 8), e de forma geral, os valores de PP para as atribuições das amostras sob o valor ótimo de K foi bem grande (acima de 0.95 na maioria dos casos), com poucas amostras apresentando atribuições mistas. Os grupos genéticos revelados na segunda rodada de análises também apresentou grande concordância com os grupos mtDNA (Figura 8), com algumas discordâncias: o grupo Cm (localidades da margem esquerda do Rio Abacaxis) foi fundido com o grupo Em (norte do interflúvio Madeira-Purus); a localidade 11 (FLONA do Trairão) foi fundida com Dm; o grupo Gm foi subdividido, em concordância com a prévia estrutura filogenética contida no interior deste grupo e com a distância geográfica (Figuras 3 e 5); o grupo Hm foi subdividido em 3 grupos, com a localidade 23 (Santa Maria) sendo agrupada com o grupo Jm, e as localidades 26 (Cachoeira das Pombas) e 31 (Projo MD) sendo classificadas em um grupo diferente das localidades mais a sul (45-47), o que também reflete a proximidade geográfica (Figura 5); o grupo Im foi subdividido entre a localidade 25 e as demais, o que também reflete a estrutura filogenética da árvore mtDNA e a proximidade geográfica (Figuras 3 e 5). Como comentado acima, os grupos recuperados no STRUCTURE foram nomeados de An até On (o “n” significa nuclear, já que essa foi a única partição usada no STRUCTURE).

#### **3.3.6.2. BPP**

As 18 diferentes combinações entre as configurações dos priors e as árvores-guia testadas convergiram para resultados similares (Figura 10). Todas as corridas foram concordantes em assinalar valores altos de PP para modelos de delimitação de



espécies que consideraram os grupos mtDNA Am, Bm, Em, Gm, Im e Jm como espécies distintas, assim como a presença dos nós envolvidos nos eventos de especiação destes grupos, que recebera valores de PP=1.0 em todas as corridas. Além disso, a análise BPP também concordou com o resultado do STRUCTURE em fundir os grupos mtDNA Dm e Fm.

De forma geral, As diferentes configurações de *priors* afetaram mais os modelos do que as diferentes árvores-guia. Os diferentes *priors* afetaram significativamente os valores de PP para a presença do evento de especiação entre os grupos Dm e Fm. Mais especificamente, os *priors* setados como grandes tamanhos populacionais ancestrais ( $\theta_s=G(1,10)$ ) e tempos de divergência rasos ( $\tau_s=G(2,2000)$ ) apresentaram baixos valores de PP para esse nó, enquanto que os *priors* especificando pequenos tamanhos populacionais ancestrais e tempos de divergência rasos ( $\theta_s= \tau_s=G(2,2000)$ ) apresentaram valores altos de PP para esse nó (Figura 10).

### 3.3.6.3. POFAD

A *multilocus network* resultante da análise POFAD foi consistente tanto com a estrutura basal quanto derivada recuperada nas análises filogenéticas e com o resultado do STRUCTURE. Novamente, as amostras foram agrupadas em 3 grupos principais, ou clados basais (Figura 9). O padrão de divergência derivado da *network* concorda largamente com o resultado obtido no STRUCTURE, e ainda fornece uma idéia das relações filogenéticas entre os grupos nucleares, ainda que a análise seja baseada em distâncias genéticas. No entanto, existem algumas discordâncias entre os resultados do POFAD e o STRUCTURE, como a localidade 17 (São Sebastião dos Bargas, AM), classificada como pertencente ao grupo Gn no STRUCTURE e estando mais próxima do grupo Jn (Figura 9) na *network*. Existem também discordâncias entre as análises filogenéticas e o resultado do POFAD. Uma delas é a relação do clado 2 (grupo mtDNA Gm e nucleares En e Fn), que na árvore mtDNA possui relação de parentesco mais próxima com o clado 1, e na *network* está mais próxima do clado 3 (na árvore bayesiana nuclear, essa relação é incerta). Outro resultado interessante, já citado acima, é a posição dúbia do possível híbrido MTR 10153, que está situado a meio caminho dos clados 2 e 3 na *network*.

### **3.3.7. Análises morfológicas**

No geral, os resultados morfológicos não concordaram com a estrutura genética revelada pela análise filogeográfica. Existe uma grande sobreposição na variação morfológica, como mostrado nas PCA's entre os espécimes classificados de acordo com os grupos mtDNA, tanto nas variáveis merísticas quanto nas morfométricas (Figuras 11 e 12). Ainda, entre as variáveis categóricas analisadas, não encontramos nenhuma que pudesse diagnosticar os espécimes de acordo com os grupos mtDNA.

## **3.4. Discussão**

### **3.4.1. Estrutura filogeográfica: processos e manutenção**

*Loxopholis osvaldoi* possui uma forte estrutura filogeográfica e profunda história evolutiva na Amazônia Central, e a curiosa distribuição geográfica das potenciais espécies revelada pelos dados moleculares são testemunha da grande complexidade do processo evolutivo que *L. osvaldoi* esteve submetido durante sua história. As estimativas de tempo de divergência, assim como as grandes distâncias genéticas entre os grupos, indicam que eventos geológicos antigos, datados do Mioceno/Plioceno, influenciaram a radiação de *L. osvaldoi* na Amazônia Central (e.g. ROSSETI *et al.*, 2005; HOORN *et al.*, 2010; RIBAS *et al.*, 2011), ao invés das mudanças ambientais do Pleistoceno, que podem ou não ter ocorrido (ver MOSBLECH *et al.*, 2012 e COHEN *et al.*, 2014), causadas pelas flutuações climáticas (HAFFER, 1969; VANZOLINI & WILLIAMS, 1970). À parte dos processos extrínsecos envolvidos na origem da estrutura filogeográfica observada (explorada em parte no capítulo anterior), a manutenção da diversidade críptica e da atual distribuição geográfica dos grupos genéticos em *L. osvaldoi* pode em parte estar relacionada com características da história natural da espécie (e.g. PAPADOPOULOU & KNOWLES, 2016). Alguns parâmetros demográficos de *L. osvaldoi* podem ser interpretados como assinaturas moleculares de uma espécie com baixa capacidade de dispersão, como a grande diversidade haplotípica, baixo compartilhamento entre populações e linhagens, isolamento por distância significativo em diferentes níveis filogenéticos, assim como a presença de microalopatria (onde cada localidade, ou grupo de localidades próximas geograficamente, são recuperadas como linhagens monofiléticas) (BOND & STOCKMAN, 2008; PETIT & EXCOFFIER, 2009;

AVILA-PIRES *et al.*, 2012; PABIJAN *et al.*, 2012; FOUQUET *et al.*, 2012; WERNECK *et al.*, 2012; FUSINATTO *et al.*, 2013; ÁLVAREZ-PRESAS *et al.*, 2014). Por sua vez, a capacidade de dispersão em lagartos é influenciada por diferentes características evolutivas-ecológicas, como dieta, sexo, relações filogenéticas e, especialmente, o tamanho (PERRY & GARLAND-JR., 2002). Um tamanho pequeno limita a capacidade de dispersão devido a restrições energéticas e metabólicas associadas com essa característica (MACE & HARVEY, 1983; REISS, 1988; PERRY & GARLAND-JR, 2002; WOLLENBERG *et al.*, 2011), aumentando assim o isolamento reprodutivo entre populações e promovendo a estruturação filogeográfica (WOLLENBERG *et al.*, 2011). Nesse sentido, a manutenção da profunda estrutura filogeográfica em *L. osvaldoi* potencialmente pode ser atribuída ao pequeno tamanho corporal (adultos possuem comprimento rostro-cloacal de aproximadamente 30 mm) e limitações fisiológicas associadas, que por sua vez podem determinar a baixa vagilidade da espécie. No entanto, essa hipótese necessita ser explicitamente testada em um contexto comparativo mais amplo, com outras espécies de lagartos com capacidades de dispersão distintas.

Em relação a reconstrução de processos históricos, a baixa vagilidade representa um poderoso aliado, dado que a filopatria promove a retenção de evidências no DNA de antigos processos demográficos (SINCLAIR *et al.*, 2004; BOND & STOCKMAN 2008; PABIJAN *et al.*, 2012; WERNECK *et al.*, 2012; ÁLVAREZ-PRESAS *et al.*, 2014), abrindo assim uma janela para compreensão dos poucos conhecidos processos geomorfológicos e geológicos durante o Neogeno no norte da América do Sul e sua influência nos processos de diversificação biótica. No entanto, paradoxalmente, a filopatria, ou baixa vagilidade, pode também levar a interpretações errôneas dos padrões geográficos de diversificação. Estudos de simulações demográficas mostraram que a baixa capacidade de dispersão e o isolamento por distância entre populações locais dão origem ao aparecimento estocástico de quebras filogeográficas e linhagens genéticas distintas, distribuídas parapatricamente, mesmo sem a aparição de uma barreira vicariante ou gradientes ambientais (i.e. habitat homogêneo) (IRWIN 2002; KUO & AVISE 2005; HOELZER *et al.*, 2008). Essa inferência

espúria pode ser contornada analisando a concordância dos padrões encontrados entre marcadores moleculares independentes. A concordância de padrões entre fontes de evidência diferentes (e.g. genomas mitocondriais e nucleares, morfologia) é um forte indicativo que os padrões observados podem ser atribuídos a presença históricas de barreiras para o fluxo gênico (KUO & AVISE, 2005, RAPOSO DO AMARAL *et al.*, 2013). Sendo assim, estamos confiantes que o padrão de distribuição geográfica das linhagens de *L. osvaldoi* refletem processos históricos antigos que ocorreram no norte da América do Sul, dado que existe uma grande concordância entre as evidências provenientes de genoma mitocondrial e nuclear. Esse resultado também demonstra a já bem documentada importância de análises multilocus para estudos filogeográficos, ao invés de inferências baseadas apenas em uma fonte de evidência (e.g. mtDNA).

#### **3.4.2. Relações filogenéticas**

Novamente, nossos resultados foram caracterizados por uma grande concordância entre as evidências mitocondriais e nucleares, assim como entre as diferentes metodologias utilizadas (filogenias concatenadas, árvore de espécies, STRUCTURE e *multilocus network*), permitindo assim a identificação de 13-14 grupos bem suportados dentro de *L. osvaldoi*. Algumas relações filogenéticas foram recorrentemente recuperadas com grande suporte independente do esquema de partição utilizado ou método, como a relação próxima de parentesco entre os grupos Am e Bm e a presença de três clados basais. No entanto, existem ainda muitas incertezas, refletidas em relações politômicas recuperadas independente dos métodos utilizados, e discordâncias entre as diferentes hipóteses filogenéticas. Esse foi o caso, por exemplo, das politomias entre as linhagens dentro dos clados 1 e 3 (Figura 5). Esse resultado pode refletir o baixo número de marcadores independentes amostrados. No entanto, estudos empíricos recentes mostram que mesmo aplicando uma abordagem de *next-generation sequence*, onde centenas de locus independentes são sequenciados, alguns nós nas filogenias continuam pouco resolvidos (*Hard Polytomies* – TUCKER *et al.*, 2016), sugerindo que, ao invés de aumentar o número de locus, a resolução destes nós esteja ligada a uma amostragem taxonômica maior (TOWNSEND & LOPEZ-GIRALDEZ, 2010). A árvore de espécies também apresentou baixos valores

de suporte para a maioria dos nós. Esse resultado provavelmente reflete um artefato metodológico de estudos ao nível filogeográfico (e.g. TOWNSEND *et al.*, 2011; WERNECK *et al.*, 2012; FUSINATTO *et al.*, 2013), dado que a árvore de espécies é altamente sensível a incertezas nas árvores de genes, como foi o caso para as nossas árvores de genes nucleares e árvore do CYTB.

O caso mais notável de discordância entre os genomas envolve a posição filogenética do clado 2, que é recuperado com bom suporte como grupo irmão do clado 1 na árvore de mtDNA e na árvore de espécies (suporte moderado), no entanto, a *multilocus network* (apenas com dados nucleares) indica uma maior proximidade do clado 2 com o clado 3. Enquanto que incongruências em níveis rasos das filogenias podem ser atribuídas a fenômenos como sorteio incompleto de linhagens, incongruências envolvendo relações profundas, como parece ser o caso entre os clados basais em *L. osvaldoi*, são principalmente causadas por saturação das mutações nos marcadores (MADDISON & KNOWLES, 2006). A relação de parentesco mais próxima entre os clados 1 e 2 parece ser um sinal contido no genoma mitocondrial, já que todas as análises que contém essa partição recuperaram este resultado. No entanto, a maior taxa de substituição deste genoma faz com que ele esteja mais inclinado para a saturação de mutações. Dado que a evidência nuclear disponível parece ser fraca, nós preferimos adotar uma abordagem conservativa e considerar essa relação como ainda não resolvida.

### **3.4.3. Padrões geográficos de distribuição**

Os rios amazônicos são amplamente reconhecidos como importantes barreiras biogeográficas, e exercem um papel central em uma das mais conhecidas hipóteses de diversificação biológica na Amazônia, a Hipótese de Rios como Barreiras (WALLACE, 1852; AYRES & CLUTTON-BROCK, 1992). Alguns estudos de caso testaram explicitamente as previsões realizadas pela hipótese dos rios (GASCON *et al.*, 2000; RIBAS *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2013; FOUQUET *et al.*, 2015; MORAES *et al.*, 2016), encontrando resultados contraditórios. No entanto, é bem estabelecido que os grandes rios atuam como limite de distribuição da biota amazônica, sendo eles os responsáveis pela diversificação ou não, em especial para primatas (ROOSMALEN *et al.*, 2002;

VALLINOTO *et al.*, 2006; DALPONTE *et al.*, 2014) e aves (CRACRAFT, 1985; RIBAS *et al.*, 2011; FERNANDES, 2013). Estranhamente, grandes rios amazônicos presentes na distribuição de *L. osvaldoi*, como o Madeira e Tapajós, não apresentaram uma influência significativa na estrutura genética de *L. osvaldoi*. Esse padrão foi proposto anteriormente com base na variação fenotípica (SOUZA *et al.*, 2013), e agora é confirmado com dados genéticos. Localidades de margens diretamente opostas do alto Rio Madeira (SL 34 x 33, 35 e 36) compartilham alguns haplótipos e são agrupados sem estrutura nas filogenias mtDNA (Im) e nuclear (Ln) (Figuras 3 e 5). Situação similar ocorre no baixo Rio Madeira (SL 22 x 21, 19 e 18) e no baixo Rio Tapajós (11, 9 x 10, 8 e 7). No entanto, o Rio Amazonas, o maior rio do mundo em volume de água, parece delimitar a distribuição do grupo Am/An, localizado na calha norte desse rio (Figuras 3 e 5). Por sua vez, o Rio Aripuanã abriga uma diversidade genética excepcional em suas margens: amostras coletadas em localidades nas margens desse rio foram resgatadas em 5 grupos mtDNA e 5 nucleares, no entanto o rio não delimita algumas dessas linhagens (Figura 5). Analizados em conjunto, esses resultados indicam que os rios representam barreiras semi-permeáveis para a movimentação de *L. osvaldoi* na paisagem. Ao invés de ativamente cruzar os rios, o transporte ativo parece ser uma hipótese mais provável, seja por balsas de vegetação ou por mudanças no curso do rio, causadas pelo fenômeno *meandering cutoff* (CONSTANTINE & DUNNE, 2008) ou por grandes mudanças de curso ao longo do tempo geológico (ROSSETI *et al.*, 2014). Essas hipóteses, no entanto, necessitam ser explicitamente testadas por experimentos em campo ou por evidências moleculares de fluxo gênico entre as margens opostas.

#### **3.4.4. Delimitação de espécies e diversidade críptica em *L. osvaldoi***

A profunda estrutura genética encontrada, assim como a concordância de padrões observados entre as partições mtDNA e nuclear (AVISE & BALL, 1990), confirmam que *L. osvaldoi* representa um complexo de espécies crípticas. Nossa análise sugere que *L. osvaldoi* é composta por no mínimo 8 espécies distintas, como indicado pelos resultados da análise BPP, mas potencialmente pode conter 14 espécies, que representa o número de grupos nucleares recuperados na análise de frequência alélica (STRUCTURE). Esses valores podem dobrar a diversidade atual do

gênero *Loxopholis*, atualmente composta por 13 espécies, mostrando que a diversidade de *Loxopholis* na Amazônia Brasileira está severamente subestimada. Esses números podem ainda atingir valores mais impressionantes quando se considera que outras espécies do gênero possuem tempos de diversificação intraespecíficos similares (ver Capítulo 2), e ainda que outras espécies do gênero dividem com *L. osvaldoi* a potencial baixa vagilidade.

As evidências para a classificação dos grupos genéticos em espécies distintas vêm de diversas fontes. As distâncias genéticas entre as potenciais espécies (*p-distance* corrigido) variou entre 10% a 12% no mtDNA. Esses valores concordam com as distâncias genéticas no mtDNA reportadas entre espécies diferentes em vários gêneros de Gymnophthalmidae, como *Vanzosaura* (RECODER et al., 2014), *Proctoporus* (DOAN & CASTOE, 2003; GOICOCHEA et al., 2012), *Anotosaura* (RODRIGUES et al., 2013) e *Calyptommatius* (SIEDCHLAG et al., 2010). A sub-divisão de *L. osvaldoi* em um número tão alto de espécies também é confirmada pela baixa evidência de hibridização entre as potenciais espécies, apesar de existirem diversas zonas de contato parapátricas. O possível caso de hibridização envolvendo as linhagens Em e Im no interflúvio Madeira-Purus (MTR 18803 e VOGT 2156) é corroborado pelas evidências no gene NT3, mas não para o KIAA2018, indicando que o agrupamento do NT3 no grupo Im pode ser resultado de uma retenção de polimorfismo ancestral. Já o caso envolvendo a amostra MTR 10153 de Cachoeira das Pombas, parece ser um caso mais provável de hibridização, visto as evidências conflitantes vindas dos genomas nuclear e mitocondrial. No geral, entretanto, as potenciais espécies de *L. osvaldoi* mostram sinais de isolamento a longo prazo entre as populações e linhagens, e fluxo gênico limitado, dada a baixa frequência de evidências de hibridização.

No entanto, mesmo com uma grande estruturação genética, a variação fenotípica de *L. osvaldoi* provou ser extremamente conservativa, e não reflete a assinatura genética da presença de várias linhagens evolutivas distintas ocorrendo dentro de *L. osvaldoi*. Há muito se sabe que a especiação pode não ser imediatamente acompanhada pela diagnose fenotípica (MAYR, 1963; BICKFORD et al., 2007), e o

desenvolvimento de ferramentas moleculares clarificou diversos casos onde a taxonomia tradicional, baseada apenas em morfologia, subestimou os níveis de diversidade em complexos de espécies (e.g. DOAN & CASTOE, 2003; GEURGAS & RODRIGUES, 2010; BRUNES *et al.*, 2014 para citar alguns casos). Nós reconhecemos que, até agora, nossa análise morfológica pode ser considerada como preliminar, já que análises mais detalhadas (e.g. morfometria geométrica, estruturas internas) podem revelar diagnoses fenotípicas para as potenciais espécies no complexo *L. osvaldoi*. No entanto, a análise de PCA foi suficiente para separar espécies com variação genética similar em outros gimnoftalmídeos (e.g. RECODER *et al.*, 2014). Sendo assim, a detecção de morfologia conservativa em *L. osvaldoi* exige uma explicação mecanicista.

Espécies crípticas podem surgir através de diferentes processos. A similaridade fenotípica entre espécies pode ser atribuída a uma provável diversificação recente, de forma que não houve tempo para que caracteres diagnósticos morfológicos se desenvolvam. Difícilmente esse é o caso em *L. osvaldoi*, onde as divergências que deram origem as potenciais espécies foram estimadas para terem ocorrido durante o Mioceno (Figura 6). A morfologia conservada pode ainda ser resultado de um sistema de reconhecimento de parceiros sexuais não-visual, como o reconhecimento de sinais químicos (BICKFORD *et al.*, 2007; GABIROT *et al.*, 2012). Essa hipótese assume que a diagnose entre espécies proximalmente aparentadas ocorre principalmente via caracteres ligados com a seleção sexual em grupos visualmente orientados, como aves por exemplo (e.g. coloração das penas), e em caracteres não-visuais (e.g. químicos) em grupos que não possuem o sentido da visão bem desenvolvidos. Nesse cenário, polimorfismos de feromônios associados com a seleção de parceiros pode evitar o cruzamento entre as populações, criando um isolamento pré-zigótico e levando a especiação (GABIROT *et al.*, 2012). Em *Loxopholis*, machos maduros exibem uma coloração ventral vermelha chamativa, indicando que, ao menos em parte, sinais visuais podem exercer um papel na escolha de machos pelas fêmeas, ou ainda em interações entre machos. Infelizmente, pouco ou nada é conhecido sobre o reconhecimento de sinais químicos em gimnoftalmídeos, deixando essa possibilidade em aberto para estudos futuros. Finalmente, a morfologia conservada pode ser o



resultado de uma seleção estabilizadora no fenótipo (BICKFORD *et al.*, 2007). Nesse cenário, hipotetizamos que a predação pode atuar como uma força seletiva na morfologia de *L. osvaldoi*, que claramente possui uma coloração disruptiva sobre o fundo formado pelo folhiço. Essa hipótese pode também explicar a presença de dois complexos de espécies crípticas em lagartos na Amazônia, *Chatogekko amazonicus* (GEURGAS & RODRIGUES, 2010) e *Iphisa elegans* (NUNES *et al.*, 2012), que dividem com *L. osvaldoi* o habitat de folhiço e o padrão de coloração disruptivo.

### **3.4.5. Conservação**

O descobrimento de diversidade críptica possui um impacto significativo no planejamento de estratégias de conservação (MORITZ & FAITH 1998, MORITZ *et al.*, 2016). Um padrão comum em estudos que lidam com delimitação de espécies em complexos crípticos é a divisão taxonômica de uma única espécie antes amplamente distribuída. As espécies novas possuem distribuições menores, possibilitando a tomada de decisões de conservação em uma escala mais fina. Neste sentido, o estudo de espécies crípticas reduz tanto o “Déficit Linneano”, i.e. um conhecimento taxonômico deficiente, quanto o “Déficit Wallaceano”, um conhecimento deficiente quanto a distribuição das espécies (WHITTAKER *et al.*, 2005). Os Déficit Wallaceano e Linneano representam sérias limitações no campo da Biogeografia da Conservação, e se apresentam maiores em regiões do globo que possuem grandes vazios de coleta de dados, dificultando estimativas adequadas de padrões de diversidade. A Amazônia Brasileira é historicamente considerada como possuindo um grande número de espécies amplamente distribuídas (e conseqüentemente pouco endemismo), devido principalmente a sua relativamente baixa heterogeneidade ambiental distribuída por uma grande área (COHN-HAFT *et al.*, 1997). No entanto, uma amostragem densa tanto em número de localidades quanto em número de indivíduos está cada vez mais revelando complexos de espécies crípticas, com padrões de distribuição intrincados (e.g. GEURGAS & RODRIGUES, 2010; NUNES *et al.*, 2012; FOUQUET *et al.*, 2012; 2014; 2016; FERNANDES, 2013; MIRALLES & CARRANZA, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2016; this study). Adicionalmente, diversos taxons novos, não crípticos, vêm sendo descritos anualmente, frutos de coleta de dados em regiões pouco amostradas (e.g.

RÖHE *et al.*, 2009; PELOSO *et al.*, 2011; ALEIXO *et al.*, 2013; COHN-HAFT *et al.*, 2013; TEIXEIRA-JR *et al.*, 2013; DALPONTE *et al.*, 2014; COLLI *et al.*, 2015). Sendo assim, um desafio considerável parece ser como incorporar esse grande corpo de conhecimento taxonômico e biogeográfico em estratégias de conservação realizadas por tomadores de decisão, rápido o suficiente para mitigar os impactos do desflorestamento da Amazônia, que continua avançando a uma taxa contínua (BROWN *et al.*, 2016; MÜLLER *et al.*, 2016).

### 3.5. Referências bibliográficas

Aleixo, A.; Portes, C.E.B.; Whittaker, A.; Weckstein, J.D.; Gonzaga, L.P.; Zimmer, K.J.; Ribas, C.C. & Bates, J. 2013. Molecular systematics and taxonomic revision of the Curve-billed Scythebill complex (*Campylorhamphus procurvoides*: Dendrocolaptidae), with description of a new species from western Amazonian Brazil. *In* Hoyo, J., Elliot, A., Sargatal, J. & Christie, D.A. (Eds.), Handbook of the Birds of the World. Special Volume: New Species and Global Index (pp. 253-257). Lynx Edicions, Barcelona, Spain.

Álvarez-Presas, M.; Sánchez-Gracia, A.; Carbayo, F.; Rozas, J. & Riutort, M. 2014. Insights into the origin and distribution of biodiversity in the Brazilian Atlantic forest hot spot: a statistical phylogeographic study using a low-dispersal organism. *Heredity* 112:656-665.

Avila-Pires, T.C.S. 1995. Lizards of Brazilian Amazonia (Reptilia: Squamata). *Zoologische Verhandelingen* 299:1–706.

Avila-Pires, T.C.S.; Mulcahy, D.G.; Werneck, F.P. & Sites Jr., J.W. 2012. Phylogeography of the teiid lizard *Kentropyx calcarata* and the sphaerodactylid *Gonatodes humeralis* (Reptilia: Squamata): Testing a geological scenario for the lower Amazon-Tocantins basins, Amazonia, Brazil. *Herpetologica* 68 (2): 272-287.

Avise, J.C.; Arnold, J.; Ball, R.M.; Bermingham, E.; Lamb, T.; Neigel, J.E.; Reeb, C.A.; Saunders, N.C. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 18: 489-522.

Avise, J.C. & Ball, R.M. 1990. Principles of genealogical concordance in species concepts and biological taxonomy. *Oxford Survey of Evolutionary Biology* 7:45–67.

Ayres, J.M.C., & T.H. Clutton-Brock. 1992. River boundaries and species range size in Amazonian primates. *American Naturalist* 140:531–537.

Beerli, P. & Felsenstein, J. 2001. Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in  $n$  subpopulations by using a coalescent approach. *Proceedings of National Academic of Sciences*, 10(98): 4563-4568.

Bickford, D.; Lohman, D.J.; Sodhi, N.S.; Ng, P.K.; Meier, R.; Winker, K.; Ingram, K.K. & Das, I. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution* 22 (3): 148–155.

Bond, J.E. & Stockman, A.K. 2008. An integrative method for delimiting cohesion species: finding the population-species interface in a group of Californian Trapdoor Spiders with extreme genetic divergence and geographic structuring. *Systematic Biology* 57(4): 628-646.

Brown, D.S.; Brown, J.C. & Brown, C. 2016. Land occupations and deforestation in the Brazilian Amazon. *Land Use Policy*, 54: 331-338.

Brunes, T.O.; Alexandrino, J.; Baeta, D.; Zina, J.; Haddad, C.F.B. & Sequeira, F. 2014. Species limits, phylogeographic and hybridization patterns in Neotropical leaf frogs (Phyllomedusinae). *Zoologica Scripta* 43(6), 586–604.

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): 785–89.

Carnaval, A.C.; Waltari, E.; Rodrigues, M.T.; Rosauer, D.; VanDerWal, J.; Damasceno, R.; Prates, I.; Strangas, M.; Spanos, Z.; Rivera, D.; Pie, M.; Firkowski, C.R.; Bornschein, M.R.; Ribeiro, L.F. & Moritz, C. 2014. Prediction of phylogeographic endemism in an environmentally complex biome. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*: 281: 20141461.

Carstens, B.C.; Pelletier, T.A.; Reid, N.M. & Satler, J.D. 2013. How to fail at species delimitation. *Molecular Ecology*, 22:4369-4383.

Cohen, M.C.L.; Rossetti, D.F.; Pessenda, L.C.R.; Friaes, Y.S. & Oliveira, P.E. 2014. Late Pleistocene glacial forest of Humaitá-Western Amazonia. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 415:37-47.

Cohn-Haft, M.; Whittaker, A. & Stouffer, P.C. 1997. A new look at the “species-poor” Central Amazon: the avifauna north of Manaus, Brazil. *Ornithological Monographs* 48:205-235.

Cohn-Haft, M.; Santos-Junior, M.A.; Fernandes, A.M. & Ribas, C.C. 2013. A new species of *Cyanocorax* jay from savannas of the central Amazon. In Hoyo, J., Elliot, A., Sargatal, J. & Christie, D.A. (Eds.), Handbook of the Birds of the World. Special Volume: New Species and Global Index (pp. 306-310). Lynx Edicions, Barcelona, Spain.

Colli, G.R.; Hoogmoed, M.S.; Cannatella, D.C.; Cassimiro, J.; Gomes, J.O.; Ghellere, J.M.; Sales-Nunes, P.M.; Pellegrino, K.C.M.; Salerno, P.; Souza, S.M. & Rodrigues, M.T. 2015. Description and phylogenetic relationships of a new genus and two new species of lizards from Brazilian Amazonia, with nomenclatural comments on the taxonomy of Gymnophthalmidae (Reptilia:Squamata). *Zootaxa* 4000(4): 401-427.

Constantine, J.A. & Dunne, T. 2008. Meander cutoff and the controls on the production of oxbow lakes. *Geology* 36(1): 23-26.

Cracraft, J. 1985. Historical biogeography and patterns of differentiation within the South American avifauna: areas of endemism. *Ornithological Monographs* 36:49-84.

Dalponte, J.C.; Silva, F.E. & Silva-Junior, J.S. 2014. New species of titi monkey, genus *Callicebus* Thomas, 1903 (Primates, Pitheciidae), from Southern Amazonia, Brazil. *Papéis Avulsos de Zoologia* 54(32): 457-472.

de Queiroz, K. 2007. Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology* 56 (6): 879-886.

Doan, T. M. & Castoe, T.A. 2003. Using morphological and molecular evidence to infer species boundaries within *Proctoporus bolivianus* Werner (Squamata: Gymnophthalmidae). *Herpetologica* 59(3): 432-449.

Evanno, G.; Regnaut, S. & Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14 (8): 2611-2620.

Fernandes, A.M. 2013. Fine-scale endemism of Amazonian birds in a threatened landscape. *Biodiversity and Conservation* 22: 2683-2694.

Fouquet, A.; Loebmann, D.; Castroviejo-Fisher, S.; Padial, J.M.; Orrico, V.G.D.; Lyra, M.L.; Roberto, I.J.; Kok, P.J.R.; Haddad, C.F.B. & Rodrigues, M.T. 2012. From Amazonia to the Atlantic Forest: Molecular phylogeny of Phyzelaphryninae frogs reveals unexpected diversity and a striking biogeographic pattern emphasizing conservation challenges. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 65: 547-561.

Fouquet, A.; Cassini, C.S.; Haddad, C.F.B.; Pech, N. & Rodrigues, M.T. 2014. Species delimitation, patterns of diversification and historical biogeography of the Neotropical frog genus *Adenomera* (Anura, Leptodactylidae). *Journal of Biogeography* 41: 855-870.

Fouquet, A.; Courtois, E.A.; Baudain, D.; Dias Lima, J.; Souza, S.M.; Noonan, B.P. & Rodrigues, M.T. 2015. The trans-riverine genetic structure of 28 Amazonian frog species is dependent on life history. *Journal of Tropical Ecology* 31(4): 361-373.

Fouquet, A.; Martinez, Q.; Zeidler, L.; Courtois, E.A.; Gaucher, P.; Blanc, M.; Lima, J.D.; Souza, S.M.; Rodrigues, M.T.; & Kok, P.J.R. 2016. Cryptic diversity in the *Hypsiboas semilineatus* species group (Amphibia, Anura) with the description of a new species from the eastern Guiana Shield. *Zootaxa*, 4084(1): 079-104.

Fusinatto, L.A.; Alexandrino, J.; Haddad, C.F.B.; Brunes, T.O.; Rocha, C.F.D. & Sequeira, F. 2013. Cryptic genetic diversity is paramount in small-bodied amphibians of the genus *Euparkerella* (Anura: Craugastoridae) endemic to the Brazilian Atlantic Forest. *PloS ONE* 8(11): : e79504. doi:10.1371/journal.pone.0079504.

Gabirot, M.; López, P. & Martin, J. 2012. Differences in chemical sexual signals may promote reproductive isolation and cryptic speciation between Iberian Wall lizard populations. *International Journal of Evolutionary Biology* doi:10.1155/2012/698520

Gascon, C.; Malcolm, J.R.; Patton, J.L.; da Silva, M.N.F.; Bogart, J.P.; Loughheed, S.C.; Peres, C.A.; Neckel, S. & Boag, P.T. 2000. Riverine barriers and the geographic distribution of Amazonian species. *Proceedings of National Academic of Sciences*, 97(25): 13672-13677.

Geurgas, S.R. & Rodrigues, M.T. 2010. The hidden diversity of *Coleodactylus amazonicus* (Sphaerodactylinae, Gekkota) revealed by molecular data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54: 583-593.

Goicoechea, N.; Padial, J.M.; Chaparro, J.C.; Castroviejo-Fisher, S. & de la Riva, I. 2012. Molecular phylogenetics, species diversity, and biogeography of the Andean lizards of the genus *Proctoporus* (Squamata: Gymnophthalmidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 65: 953-964.

Goicoechea, N.; Frost, D.R.; de la Riva, I.; Pellegrino, K.C.M.; Sites-Jr, J.; Rodrigues, M.T.; & Padial, J.M. 2016. Molecular systematics of teioid lizards (Teioidea/Gymnophthalmoidea: Squamata) based on the analysis of 48 loci under tree-alignment and similarity-alignment. *Cladistics* doi: 10.1111/cla.12150.

Gould, S.J. & Johnston, R.F. 1972. Geographic variation. *Annual Reviews of Ecology and Systematics*, 3: 457-498.

Haffer, J. 1969. Speciation in Amazonian forest birds. *Science* 165: 131-136.

Heled, J. & Drummond, A.J. 2010. Bayesian inference of species trees from multilocus data. *Molecular Biology and Evolution*, 27(3): 570-580.

Maddison, W.P. & Knowles, L.L. 2006. Inferring phylogeny despite incomplete lineage sorting. *Systematic Biology* 55(1): 21-30.

Mayr, E. 1963. *Animal Species and Evolution*, Harvard University Press

Hickerson, M.J.; Carstens, B.C.; Cavender-Bares, J.; Crandall, K.A.; Graham, C.H.; Johnson, J.B.; Rissler, L.; Victoriano, P.F. & Yoder, A.D. 2010. Phylogeography's past, present, and future: 10 years after *Awise*, 2000. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54:291-301.

Hoelzer, G.A.; Drewes, R.; Meier, J. & Dorsat, R. 2008. Isolation-by-distance and outbreeding depression are sufficient to drive parapatric speciation in the absence of environmental influences. *PLOS Computational Biology* 4(7): e1000126.

Hoorn, C.; Wesselingh, F.P.; Ter Steege, H.; Bermudez, M.A.; Mora, A.; Sevink, J.; Sanmartín, I.; Sanchez-Meseguer, A.; Anderson, C.L.; Figueiredo, J.P.; Jaramillo, C.; Riff, D.; Negri, F.R.; Hooghiemstra, H.; Lundberg, J.; Stadler, T.; Särkinen, T. & Antonelli, A.

2010. Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. *Science* 330:927-931.

Irwin, D.E. 2002. Phylogeographic breaks without geographic barriers to gene flow. *Evolution* 56 (12): 2383-2394.

Joly, S. & Bruneau, A. 2006. Incorporating allelic variation for reconstructing the evolutionary history of organisms from multiple genes: an example from *Rosa* in North America. *Systematic Biology* 55(4): 623-636.

Kaefer, I.L.; Tsuji-Nishikido, B.M.; Mota, E.P.; Farias, I.P.; Lima, A.P. 2013. The early stages of speciation in Amazonian forest frogs: phenotypic conservatism despite strong genetic structure. *Evolutionary Biology*, 40:228-245.

Knowles, L.L. & Maddison, W.P. 2002. Statistical Phylogeography. *Molecular Ecology* 11: 2623-2635.

Knowles, L.L. 2009. Statistical Phylogeography. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 40: 593-612.

Kuo, C.H. & Avise, J.C. 2005. Phylogeographic breaks in low-dispersal species: the emergence of concordance across gene trees. *Genetica* 124: 179-186

Lanfear, R.; Calcott, B.; Ho, S.Y.W. & Guindon, S. 2012. PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution* 29: 1695–1701. doi:10.1093/molbev/mss020. PubMed: 22319168.

Leaché, A.D.; & Fujita, M.K. 2010. Bayesian species delimitation in West African forest geckos (*Hemidactylus fasciatus*). *Proceedings of the Royal Society B – Biological Sciences* 277:3071-3077.

Leite, R.N. & Rogers, D.S. 2013. Revisiting Amazonian phylogeography: insights into diversification hypotheses and novel perspectives. *Organisms Diversity & Evolution*, 13: 639-664.

Librado, P. & Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25:1451-1452.

Mace, G. M. & Harvey, P.H. 1983. Energetic constraints on home-range size. *American Naturalist* 121:120-132.

Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27 (2): 209–220.

Mayden, R. L. 1997. A hierarchy of species concepts: The denouement in the saga of the species problem. Pages 381–424 in “Species: The units of biodiversity” (M. F. Claridge, H. A. Dawah, and M. R. Wilson, eds.). Chapman and Hall, London.

Mayr, E. 1963. *Animal Species and Evolution*, Harvard University Press.

Miralles, A. & Carranza, S. 2010. Systematics and biogeography of the Neotropical genus *Mabuya*, with special emphasis on the Amazonian skink *Mabuya nigropunctata* (reptilia: Scincidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54: 857-869.

Mittermeier, R.A.; Myers, N.; Mittermeier, C.G. & Robles-Gil, P. 1999. Hotspots: Earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. CEMEX.

Moraes, L.J.C.L.; Pavan, D.; Barros, M.C. & Ribas, C. 2016. The combined influence of riverine barriers and flooding gradients on biogeographical patterns for amphibians and squamates in south-eastern Amazonia. *Journal of Biogeography* doi:10.1111/jbi.12756

Moritz, C. & Faith, D. 1998. Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. *Molecular Ecology* 7: 419-429.

Moritz, C.; Fujita, M.K.; Rosauer, D.; Agudo, R.; Bourke, G.; Doughty, P.; Palmer, R.; Pepper, M.; Potter, S.; Pratt, R.; Scott, M.; Tonione, M. & Donnellan, S. 2016. Multilocus phylogeography reveals nested endemism in a gecko across the monsoonal tropics of Australia. *Molecular Ecology*, 25: 1354-1366.

Mosblech, N.A.S.; Bush, M.B.; Gosling, W.D.; Hodell, D.; Thomas, L.; van Calsteren, P.; Correa-Metrio, A.; Valencia, B.G.; Curtis, J. & van Woesik, R. 2012. North Atlantic forcing of Amazonian precipitation during the last ice age. *Nature Geoscience* 5: 817-820.

Müller, H.; Griffiths, P. & Hostert, P. 2016. Long-term deforestation dynamics in the Brazilian Amazon- Uncovering historic frontier development along the Cuiabá-Santarém highway. *International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation*, 44: 61-69.



Nunes, P.M.S.; Fouquet, A.; Curcio, F.; Kok, P.J.R. & Rodrigues, M.T. 2012. Cryptic species in *Iphisa elegans* Gray, 1851 (Squamata: Gymnophthalmidae) revealed by hemipenial morphology and molecular data. *Zoological Journal of Linnean Society* 166: 361-376.

Oliveira, D.P.; Carvalho, V.T. & Hrbek, T. 2016. Cryptic diversity in the lizard genus *Plica* (Squamata): phylogenetic diversity and Amazonian biogeography. *Zoologica Scripta*, doi: 10.1111/zsc.12172

O'Meara BC, Jackson ND, Morales-Garcia AE, Carstens BC .2015. Phylogeographic inference using approximate likelihoods, doi:10.1101/025353.

Padial, J.M.; Miralles, A.; Riva, I.D.L. & Vences, M. 2010. The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology*, 7:1-16.

Pabijan, M.; Wollenberg, K.C. & Vences, M. 2012. Small body size increases the regional differentiation of populations of tropical mantellid frogs (Anura:Mantellidae). *Journal of Evolutionary Biology* 25(11): 1-15.

Palumbi, S. R.; Cipriano, F. & Hare, M.P. 2001. Predicting nuclear gene coalescence from mitochondrial data: the three-times rule. *Evolution* 55 (5): 859-868.

Papadopoulou, A. & Knowles, L.L. 2016. Toward a paradigm shift in comparative phylogeography driven by trait-based hypothesis. *Proceedings of National Academic of Sciences*, 113(29): 8018-8024.

Paz A, Ibáñez R, Lips KR, Crawford AJ (2015) Testing the role of ecology and life history in structuring genetic variation across a landscape: A trait-based phylogeographic approach. *Molecular Ecology*, 24(14):3723–3737.

Pellegrino, K.C.M.; M.T. Rodrigues; Y. Yonenaga-Yassuda & J.W. Sites Jr. 2001. A molecular perspective on the evolution of microteiid lizards (Squamata, Gymnophthalmidae), and a new classification for the family. *Biological Journal of Linnean Society* 74: 315-338.

Pellegrino, K.C.M.; M.T. Rodrigues; D.J. Harris; Y. Yonenaga-Yassuda & J. W. Sites Jr. 2011. Molecular phylogeny, biogeography and insights into the origin of parthenogenesis in the Neotropical genus *Leposoma* (Squamata: Gymnophthalmidae):

Ancient links between the Atlantic Forest and Amazonia. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 61 (1): 446-459.

Peloso, P.L.V.; Pellegrino, K.C.M.; Rodrigues, M.T. & Avila-Pires, T.C.S. 2011. Description and phylogenetic relationships of a new genus and species of lizard (Squamata, Gymnophthalmidae) from the Amazonian Rainforest of northern Brazil. *American Museum Novitates* 3713: 1-24.

Petit, R.J. & Excoffier, L. 2009. Gene flow and species delimitation. *Trends in Ecology and Evolution* 24(7): 386-393.

Perry, G. & Garland-Jr., T. 2002. Lizard home ranges revisited: effects of sex, body size, diet, habitat, and phylogeny. *Ecology* 83(7): 1870-1885.

Prates, I.; Rivera, D.; Rodrigues, M.T. & Carnaval, A.C. 2016. A mid-Pleistocene rainforest corridor enabled synchronous invasions of the Atlantic Forest by Amazonian anole lizards. *Molecular Ecology*, doi: 10.1111/mec.13821.

Pritchard; J.K.; Stephens, M. & Donnelly; P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.

Raposo do Amaral, F.; Albers, P.K.; Edwards, S.V. & Miyaki, C.Y. 2013. Multilocus tests of Pleistocene refugia and ancient divergence in a pair of Atlantic Forest antbirds (Myrmeciza). *Molecular Ecology* 22(15): 3996-4013

Recoder, R.S.; Werneck, F.P.; Teixeira Jr., M.; Colli, G.R. Sites Jr., J.W. & Rodrigues, M.T. 2014. Geographic variation and systematic review of the lizards genus *Vanzosaura* (Squamata, Gymnophthalmidae), with the description of a new species. *Zoological Journal of Linnean Society* 171:206-225.

Reiss, M. 1988. Scaling home range size: body size, metabolic needs and ecology. *Trends in Ecology and Evolution* 3:85-86.

Ribas, C.C.; Aleixo, A.; Nogueira, A.C.R.; Miyaki, C.Y. & Cracraft, J. 2011. A palaeobiogeographic model for biotic diversification within Amazonia over the past three million years. *Proceedings of the Royal Society B - Biological Sciences* doi:10.1098/rspb.2011.1120.

Rodrigues, M.T.; Teixeira Jr., M; Dal Vechio, F.; Amaro, R.C.; Nisa, C.; Guerrero, A.C.; Damasceno, R.; Roscito, J.G.; Nunes, P.M.S. & Recoder, R.S. 2013. Rediscovery

of the earless microteiid lizard *Anotosaura collaris* Amaral, 1933 (Squamata: Gymnophthalmidae): A redescription complemented by osteological, hemipenial, molecular, kariological, physiological and ecological data. *Zootaxa* 3731(3): 345-370.

Röhe, F. ; Silva-Junior, J. S. E. ; Sampaio, R. & Rylands A. B. 2009. A new subspecies of saddleback tamarin, *Saguinus fuscicollis* (Primates, Callitrichidae). *International Journal of Primatology*, 30(4): 533-551.

Ronquist, F.; Teslenko, M.; van der Mark, P.; Ayres, D.L. Darling, A. Höhna, S.; Larget, B.; Liu, L.; Suchard, M. & Huelsenbeck, J.P. 2012. MrBayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 6(3): 539-542.

Roosmalen, M.G.M.; Roosmalen, T. & Mittermeier, R.A. 2002. A taxonomic review of the Titi Monkeys, genus *Callicebus* Thomas, 1903, with the description of two new species, *Callicebus bernhardi* and *Callicebus stephennashii*, from Brazilian Amazonia. *Neotropical Primates* 10(Suppl.):1-52.

Rosseti, D.F.; Cohen, M.C.L.; Bertani, T.C.; Hayakawa, E.H. Paz, J.D.S.; Castro, D.F. & Friaes, Y. 2014. Late quarternary fluvial terrace evolution in the main southern Amazonian tributary. *Catena* 116:19-37.

Rossetti, D. F.; Toledo, P. M. & Góes, A. M. 2005. New geological framework for Western Amazonia (Brazil) and implications for biogeography and evolution. *Quaternary Research* 63: 78–89.

Rull, V. 2011. Neotropical biodiversity: timing and potential drivers. *Trends in Ecology and Evolution*, 26(10): 508-513.

Salzburger, W.; Ewing, G.B. & von Haeseler, A. 2011. The performance of phylogenetic algorithms in estimating haplotype genealogies with migration. *Molecular Ecology* 20: 1952-1963.

Siedschlag, A.C.; Benozzati, M.L.; Passoni, J.C. & Rodrigues, M.T. 2010. Genetic structure, phylogeny, and biogeography of Brazilian eyelid-less lizards of genera *Calyptommatius* and *Nothobachia* (Squamata, Gymnophthalmidae) as inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56: 622-630.

Simões, P.I.; Lima, A.P. & Farias, I.P. 2010. The description of a cryptic species related to the pan-Amazonian frog *Allobates femoralis* (Boulenger 1883) (Anura: Aromobatidae). *Zootaxa*, 2406: 1-28.

Sinclair, E. A.; Bezy, R. L.; Bolles, K.; Camarillo, J. L.; Crandall, K. A.; & Sites, J.W. 2004. Testing species boundaries in an ancient species complex with deep phylogeographic history: Genus *Xantusia* (Squamata: Xantusiidae). *American Naturalist* 164:396–414.

Souza, S.M.; Rodrigues, M.T. & Cohn-Haft, M. 2013. Are Amazonia rivers biogeographic barriers for lizards? A study on the geographic variation of the Spectacled Lizard *Leposoma osvaldoi* Avila-Pires (Squamata, Gymnophthalmidae). *Journal of Herpetology* 47(3): 511-519.

Teixeira Jr., M.; Dal Vechio, F.; Nunes, P.M.S.; Neto, A.M.; Lobo, L.M.; Storti, L.F.; Gaiga, R.A.J.; Dias, P.H.F. & Rodrigues, M.T. 2013. A new species of *Bachia* Gray, 1845 (Squamata: Gymnophthalmidae) from the western Brazilian Amazonia. *Zootaxa* 3636(3): 401-420.

Thomé, M.T.C. & Carstens, B.C. 2016. Phylogeographic model selection leads to insight into the evolutionary history of four-eyed frogs. *Proceedings of National Academic of Sciences*, 113(29): 8010-8017.

Townsend, J.P. & Lopez-Giraldez, F. 2010. Optimal selection of gene and ingroup taxon sampling for resolving phylogenetic relationships. *Systematic Biology* 59: 446-457.

Townsend, T.M.; Mulcahy, D.G.; Noonan, B.P.; Sites, J.W. Jr.; Kuczynski, C.A.; Wiens, J.J. & Reeder, T.W. 2011. Phylogeny of iguanian lizards inferred from 29 nuclear loci, and a comparison of concatenated and species-tree approaches for an ancient, rapid radiation. *Mol Phylogenet Evol* 61: 363–380.

Tucker, D.B.; Colli, G.R., Giugliano, L.G.; Hedges, S.B.; Hendry, C.R.; Lemmon, E.M.; Lemmon, A.R.; Sites Jr., J.W. & Pyron, R.A. 2016. Methodological congruence in phylogenomic analyses with morphological support for teiid lizards (Sauria:Teiidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 103:75-84.

Vallinoto, M.; Araripe, J.; do Rego, P.S.; Tagliaro, C.H.; Sampaio, I. & Schneider, H. 2006. Tocantins river as an effective barrier to gene flow in *Saguinus niger* populations. *Genetics and Molecular Biology* 29(2): 215-219.

Vanzolini, P.E. & Williams, E.E. 1970. South American anoles: the geographic differentiation and evolution of the *Anolis chrysolepis* species group (Sauria, Iguanidae). *Arquivos de Zoologia* 19 (1-2): 1-124.

Wallace, A.R. 1852. On the monkeys of the Amazon. *Proceedings of Zoological Society of London* 20: 107-110.

Werneck, F.P.; Gamble, T.; Colli, G.R.; Rodrigues, M.T. & Sites, J.W. 2012. Deep diversification and long-term persistence in the south american 'dry diagonal': integrating continent-wide phylogeography and distribution modeling of geckos. *Evolution*, 66(10): 3014-3034.

Werneck, F.P.; Leite, R.N.; Geurgas, S.R. & Rodrigues, M.T. 2015. Biogeographic history and cryptic diversity of saxicolous Tropiduridae lizards endemic to the semiarid Caatinga. *BMC Evolutionary Biology* 15:94 doi 10.1186/s12862-015-0368-3

Whittaker, R.J.; Araújo, M.B.; Jepson, P.; Ladle, R.J.; Watson, J.E.M. & Willis, K.J. 2005. Conservation Biogeography: assessment and prospect. *Diversity and Distributions*, 11: 3-23.

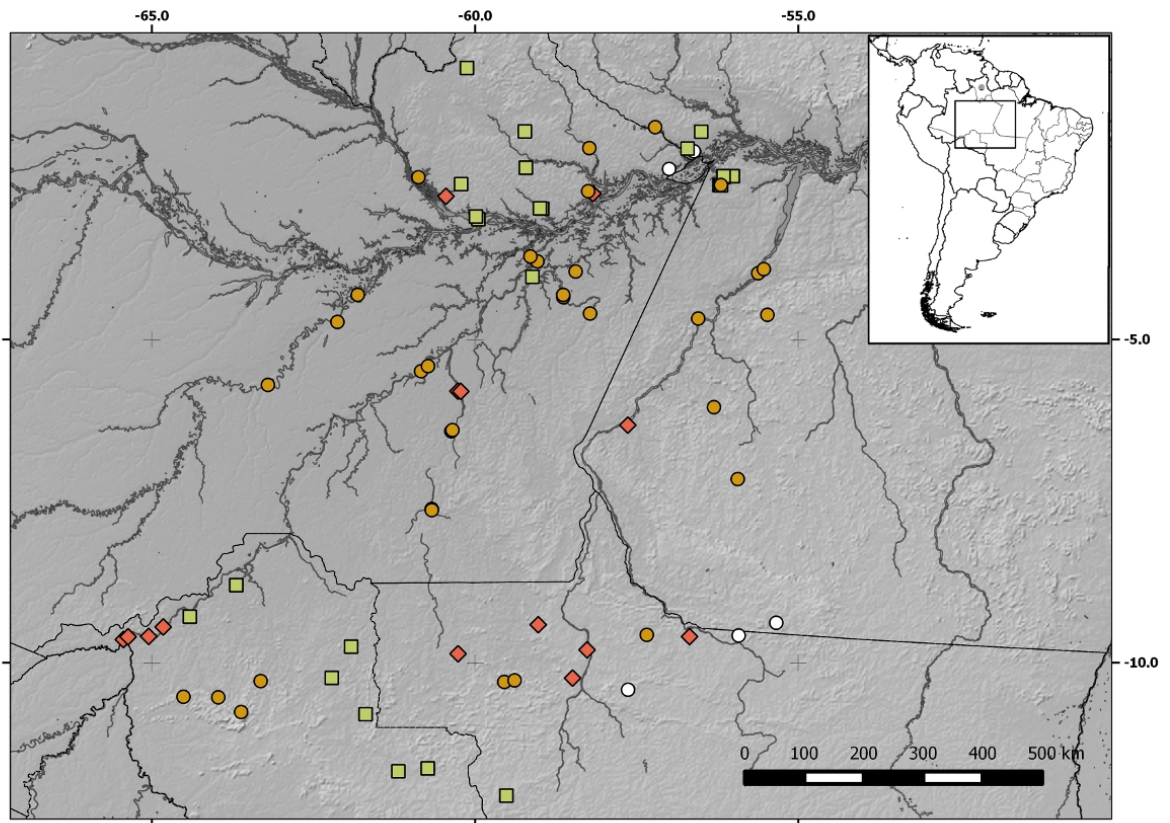
Wollenberg, K.C.; Vieites, D.R.; Glaw, F. & Vences, M. 2011. Speciation in little: the role of range and body size in the diversification of Malagasy mantellid frogs. *BMC Evolutionary Biology*, 11:217.

Yang, Z. 2015. The BPP program for species tree estimation and species delimitation. *Current Zoology* 61 (5): 854-865

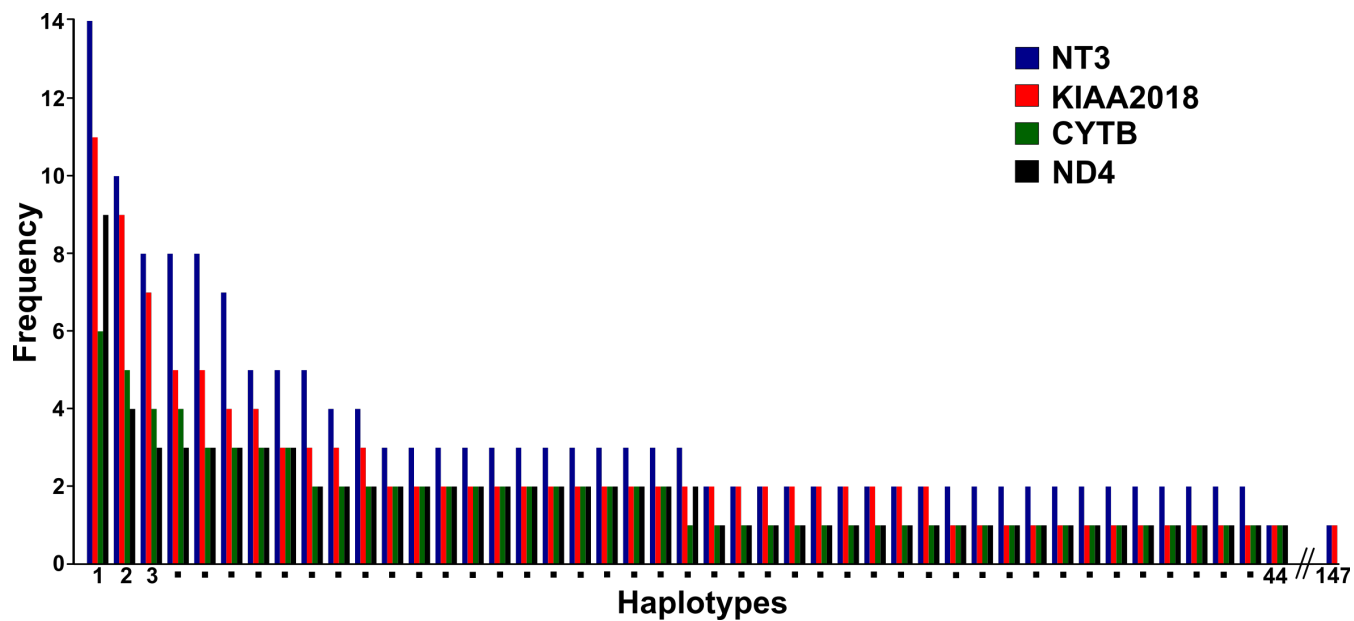
Yang, Z. & Rannala, B. 2010. Bayesian species delimitation using multilocus sequence data. *Proceedings of National Academic of Sciences*, 107(20): 9264–9269. doi:10.1073/pnas.0913022107.

Zamudio, K. R.; Bll, R.C. & Mason, N.A. 2016. Phenotypes in phylogeography: Species' traits, environmental variation and vertebrate diversification. *Proceedings of National Academic of Sciences*, 113(29): 8041-8048.

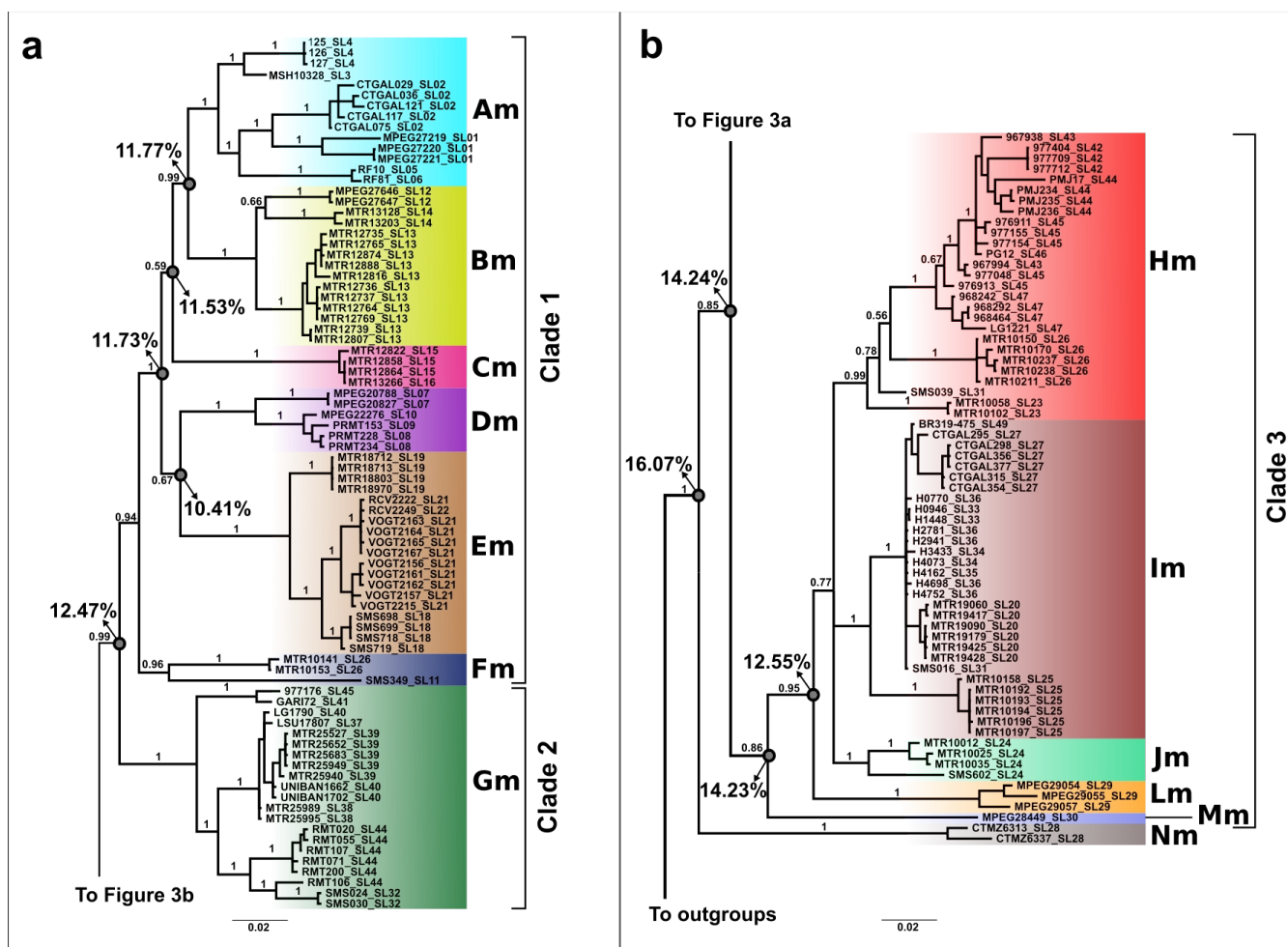
### 3.6. Figuras



**Figura 1.** Distribuição de *Loxopholis osvaldoi* na Amazônia Central. Circulos laranjas: localidades com dados genéticos e morfológicos; diamantes salmão: apenas dados genéticos; quadrados verde-claros: apenas dados morfológicos; circulos brancos: dados de literatura e bancos de dados de museus.

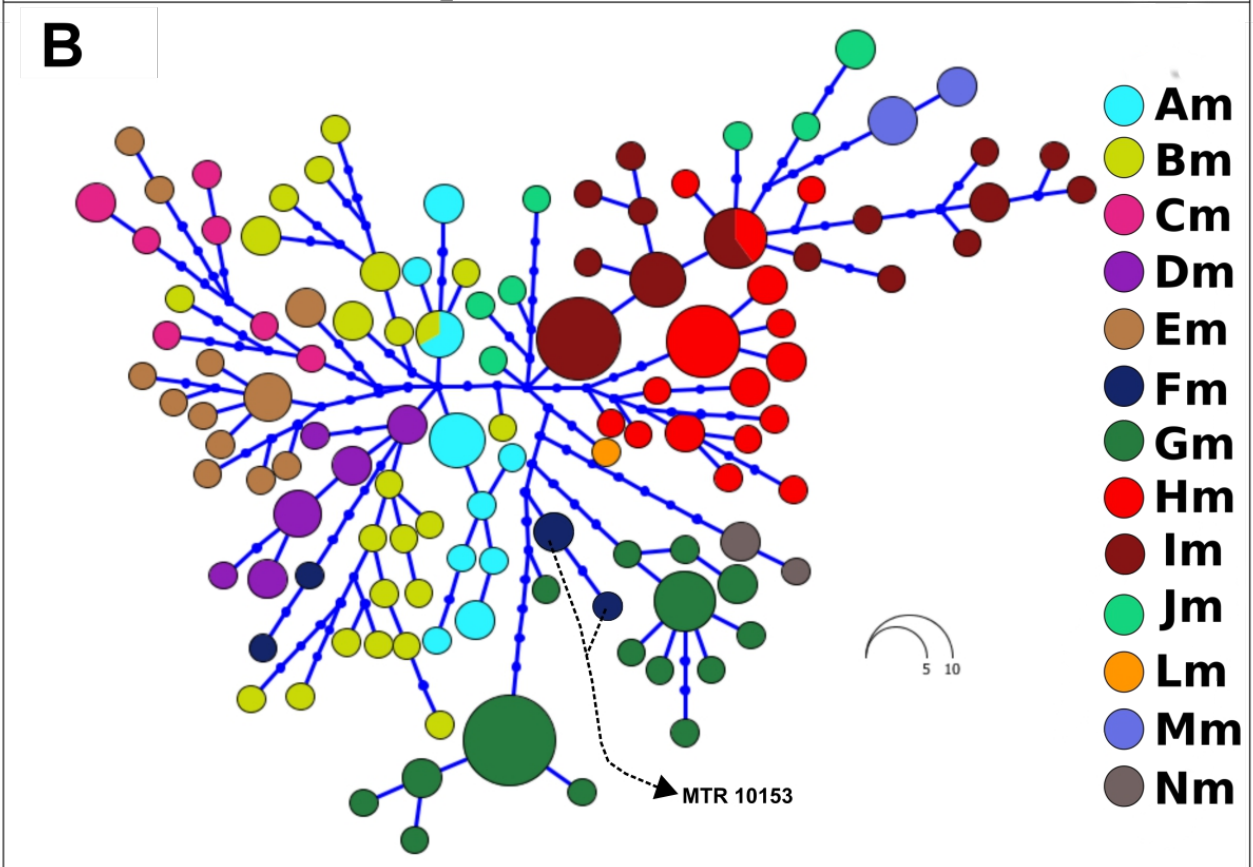
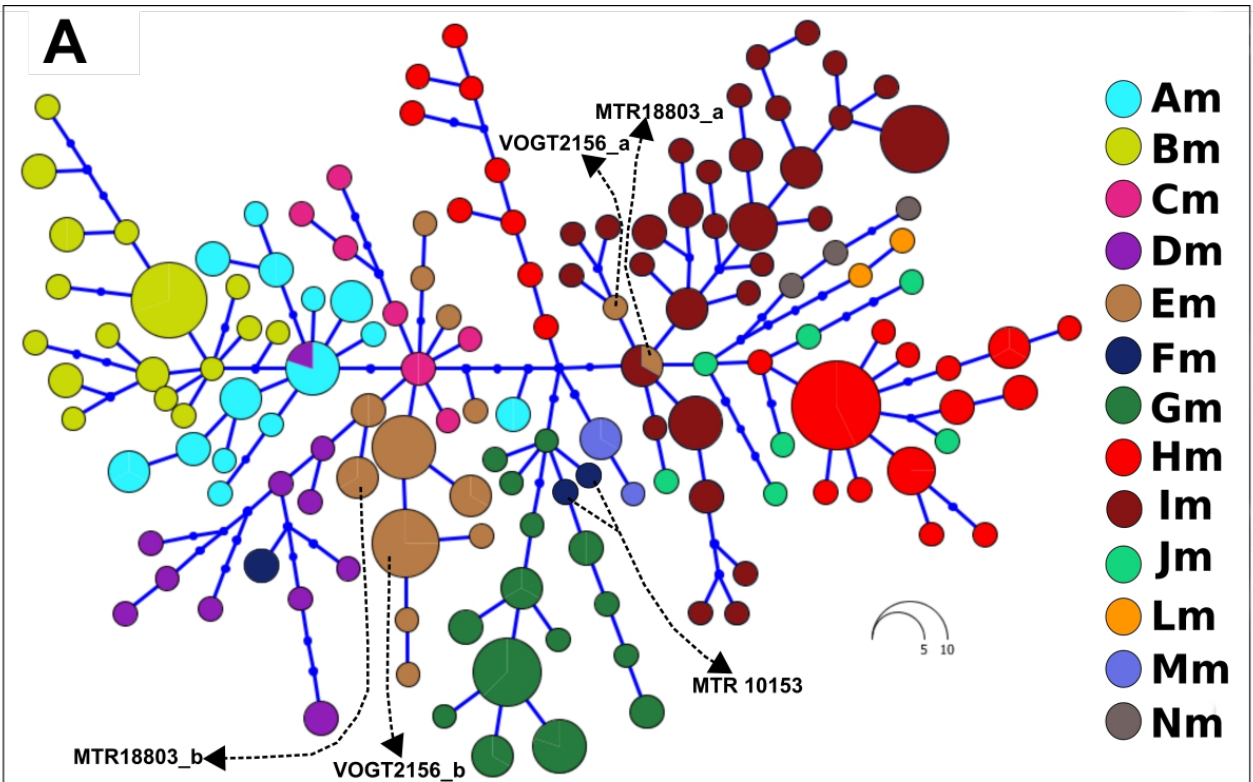


**Figure 2.** Frequência de distribuição dos haplótipos em 4 fragmentos de genes distintos sequenciados para *Loxopholis osvaldoi*. Notar a grande cauda das distribuições a direita.

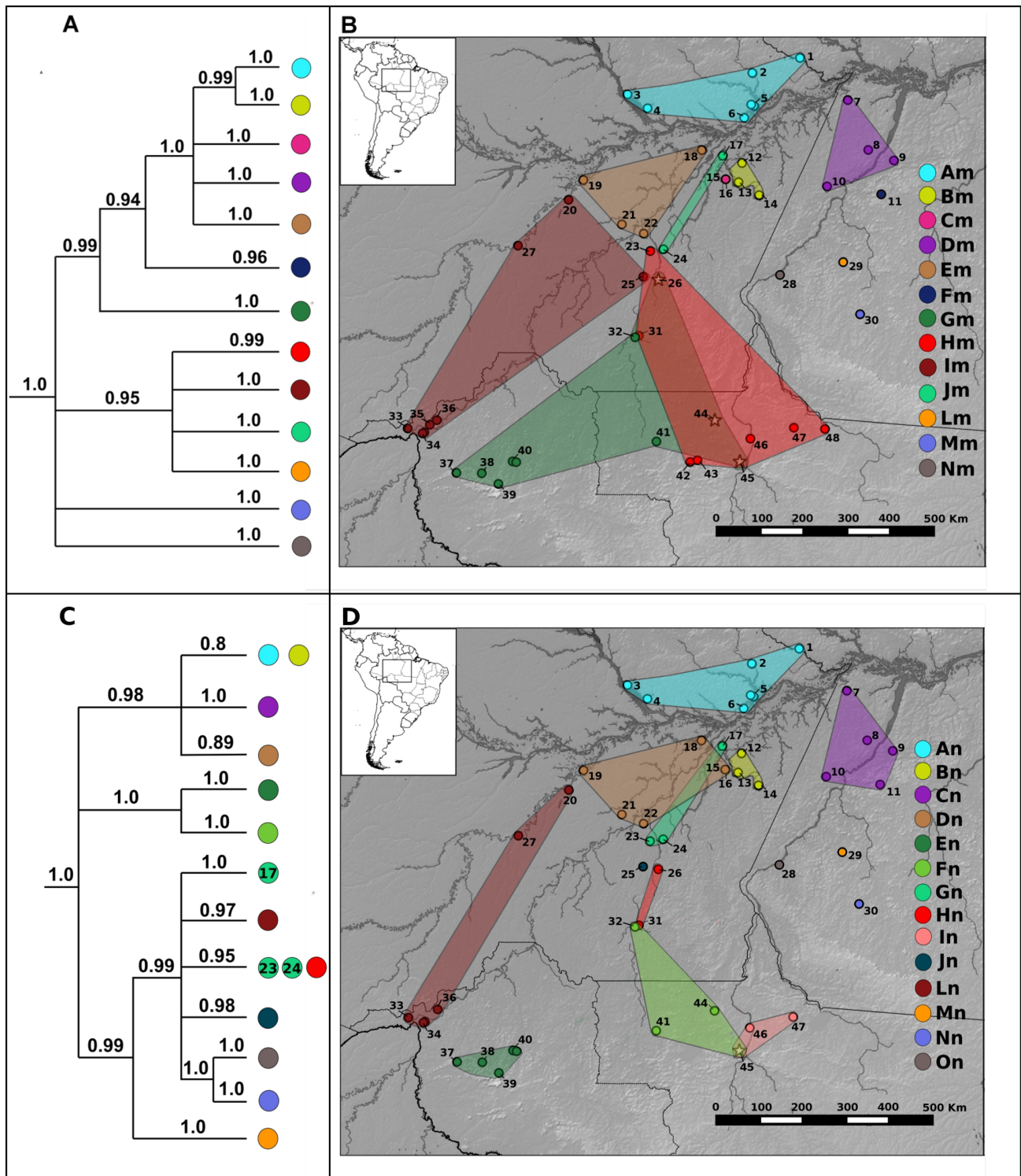


**Figura 3 A e B.** Árvore de Máxima Probabilidade Posterior (MAP) de *Loxopholis osvaldoi* inferida com o MrBayes para os dois marcadores mitocondriais concatenados (CYTB e ND4). Números atrás dos nós representam valores de probabilidade posterior para aquele nó. Os terminais estão nomeados com o número dos vouchers e o código da localidade (SL – ver Figura 5 e Tabela 1 para nomes das localidades e localização geográfica). Cores e acrônimos indicam grupos mitocondriais identificados e usados em análises subsequentes. Valores nos nós marcados com círculos cinzas indicam a distância genética mitocondrial média par a par entre os terminais.



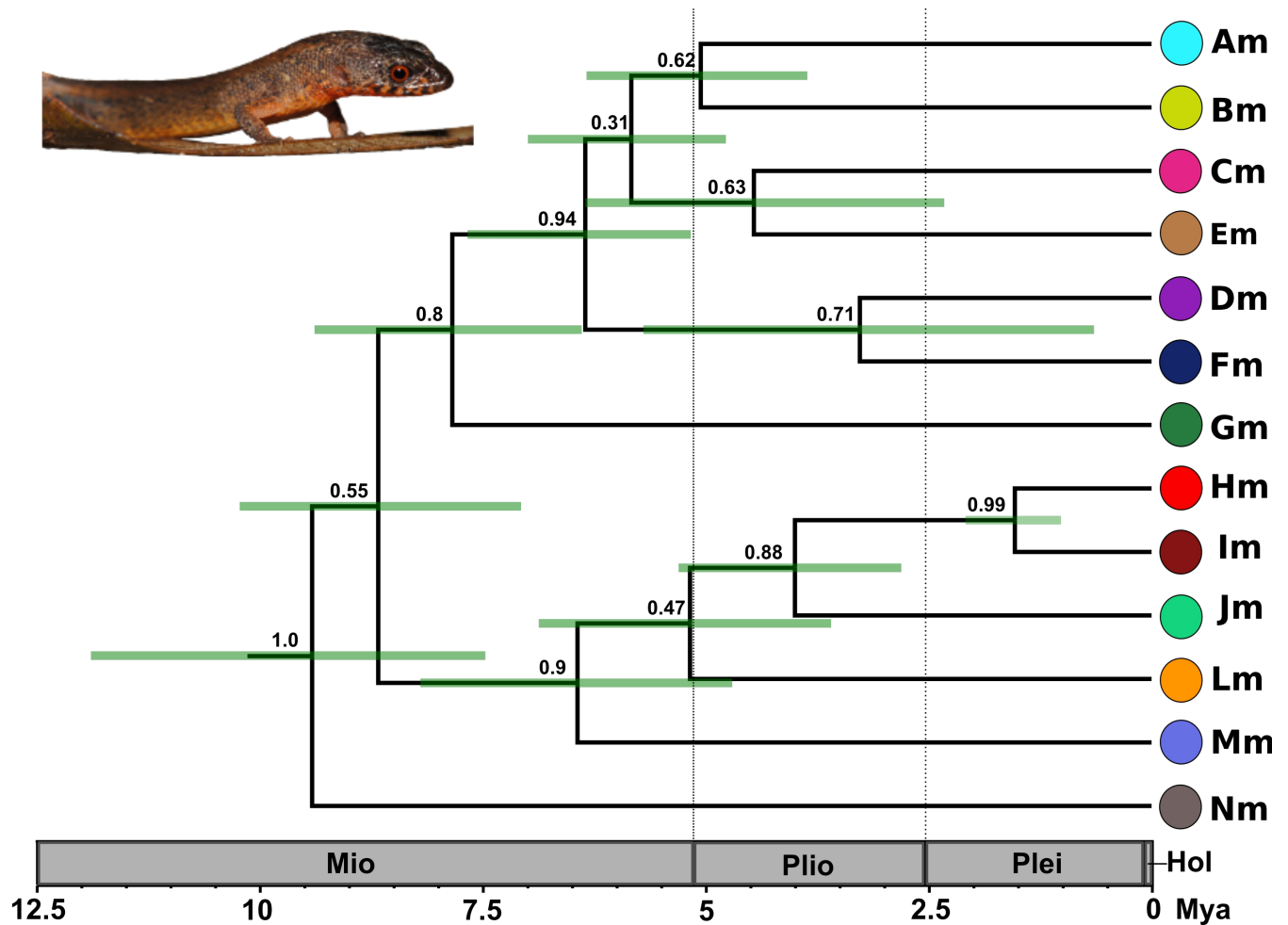


**Figure 4.** Genealogias de haplótipos dos genes nucleares. A: NT3; B: KIAA2018.

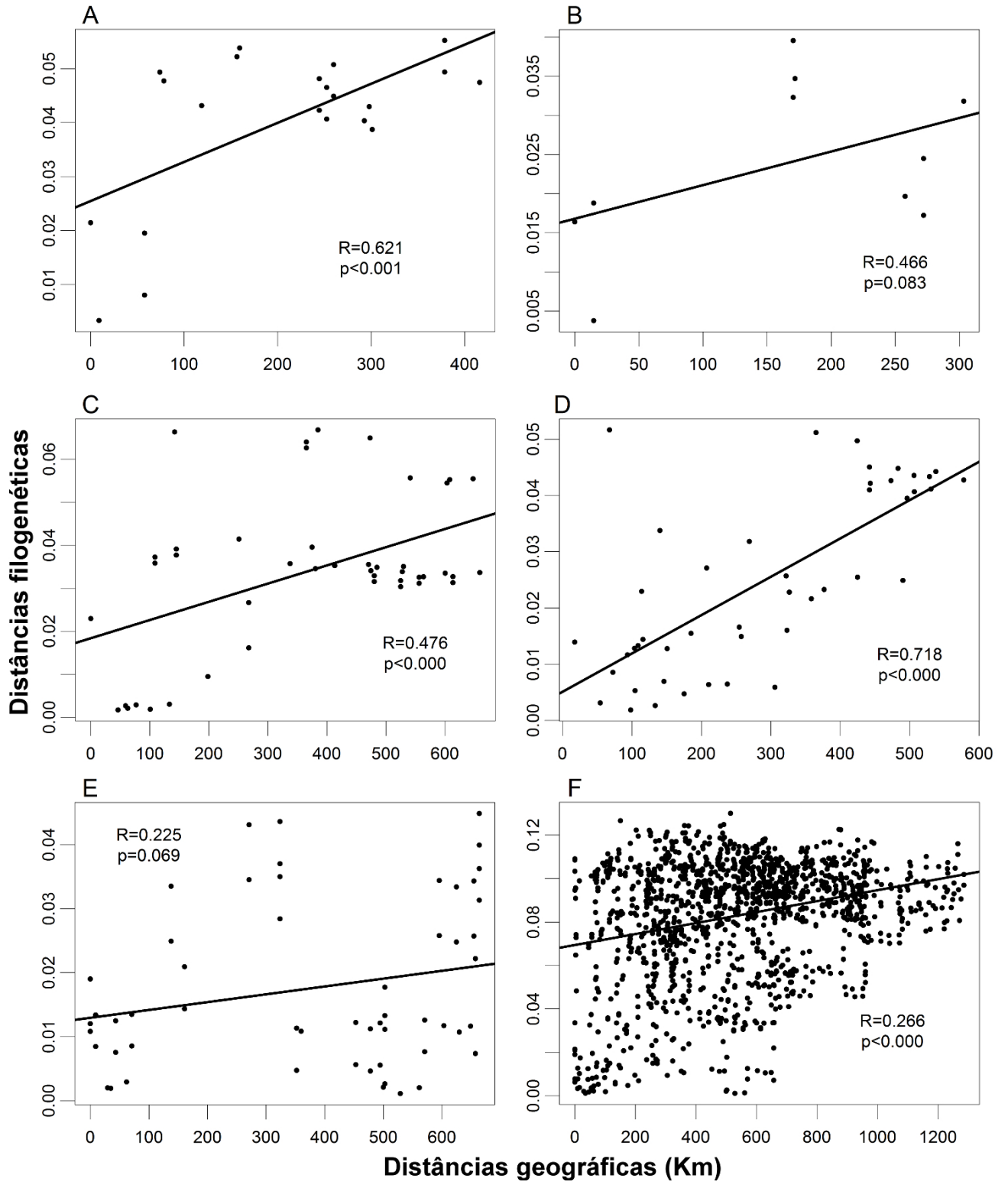


**Figura 5.** A: Relações filogenéticas entre os grupos mtDNA baseadas na filogenia Bayesiana da figura 3. Nós com menos de 0,9 de PP da Figura 3 foram colapsados; B: distribuição geográfica dos grupos mtDNA; C: Árvore bayesiana dos genes nucleares

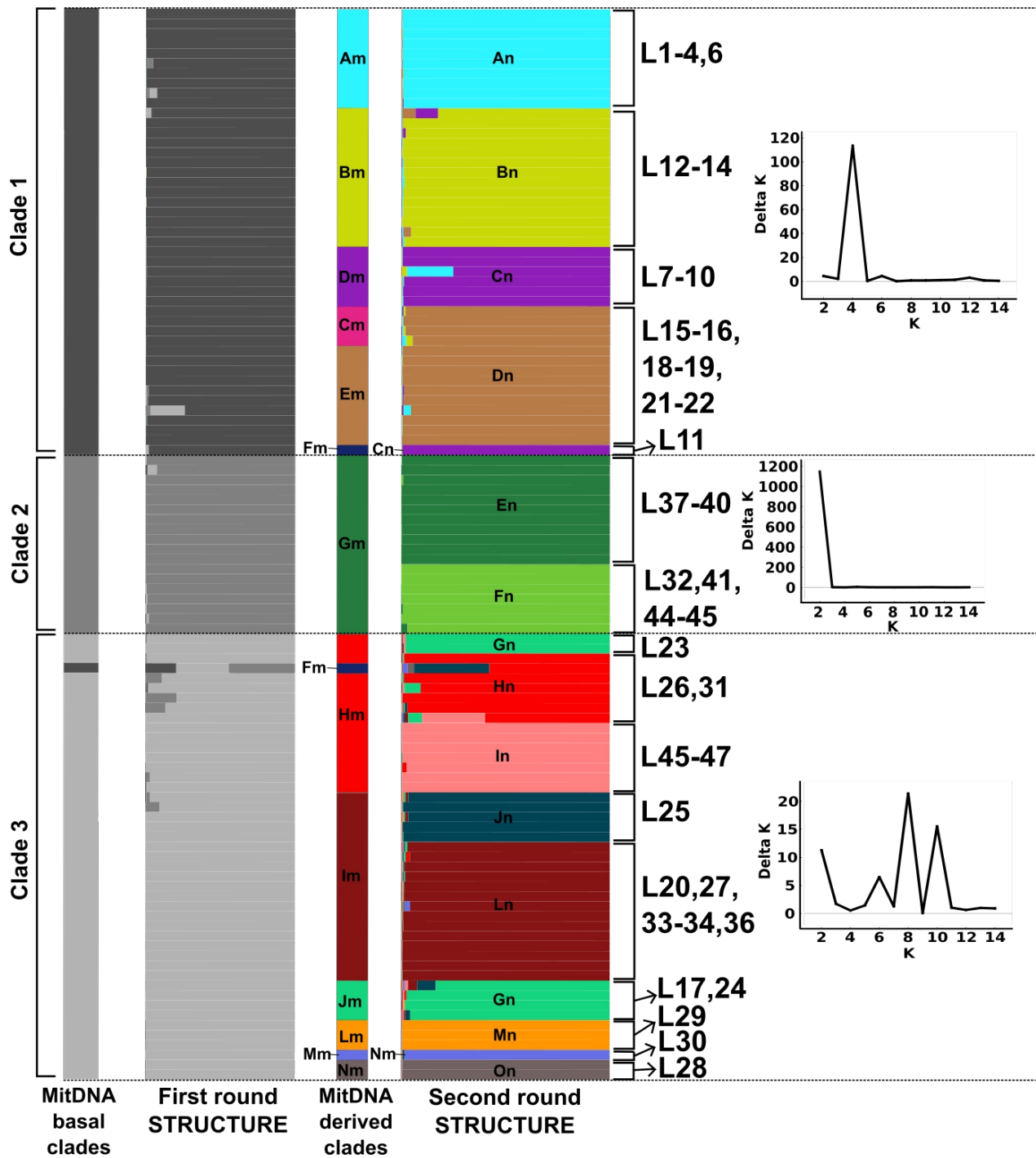
concatenados, com os terminais agrupados de acordo com os resultados do STRUCTURE. Nós com menos de 0,9 de PP foram colapsados; D: distribuição geográfica dos grupos nucleares. Em A e B, os números atrás dos nós representam valores de PP para aquele nó. Em B e D, estrelas representam localidades onde indivíduos de mais de um grupo ocorrem na mesma localidade.



**Figure 6.** Árvore de espécies mostrando as relações filogenéticas entre os grupos mtDNA resultantes da análise no \*BEAST. Barras verdes nos nós representam o intervalo de confiança (95% HPD) da estimativa de tempo de diversificação. Números atrás dos nós representam valores de PP para o referido nó. Hol: Holoceno; Mio: Mioceno; Mya: milhões de anos atrás; Plei: Pleistoceno; Plio: Plioceno.



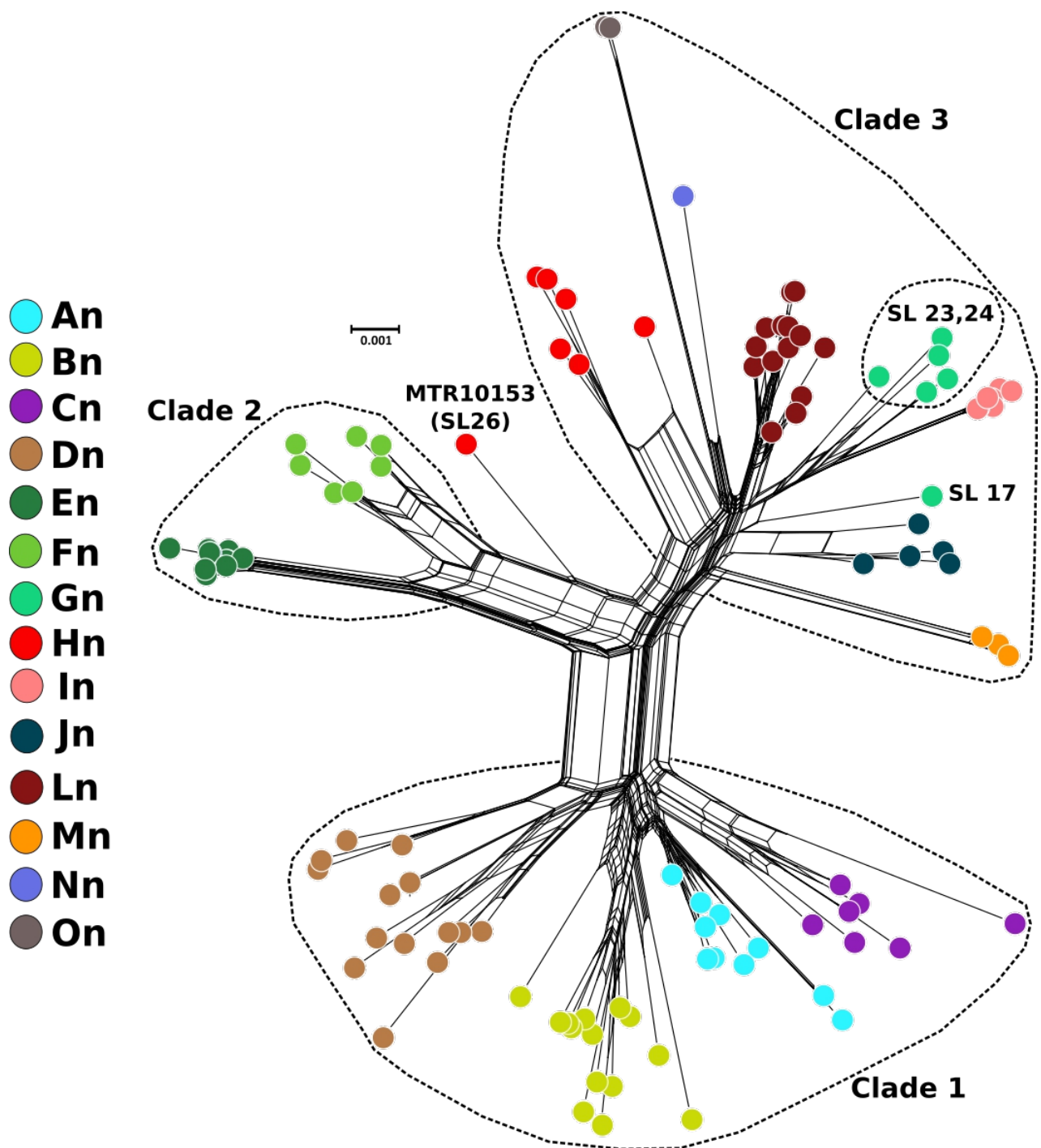
**Figure 7.** Gráficos de dispersão entre a distância filogenética par a par e as distâncias geográficas entre as amostras dos grupos mitDNA. A: grupo Am; B: Em; C: Gm; D: Hm, E: Im; F: todas as amostras.



**Figure 8.** Resultados do STRUCTURE plotados contra a classificação das amostras obtida segundo a árvore mtDNA, com as classificações representadas com escalas de cinza referindo a classificação basal e em cores a classificação derivada. Valores de  $\Delta K$

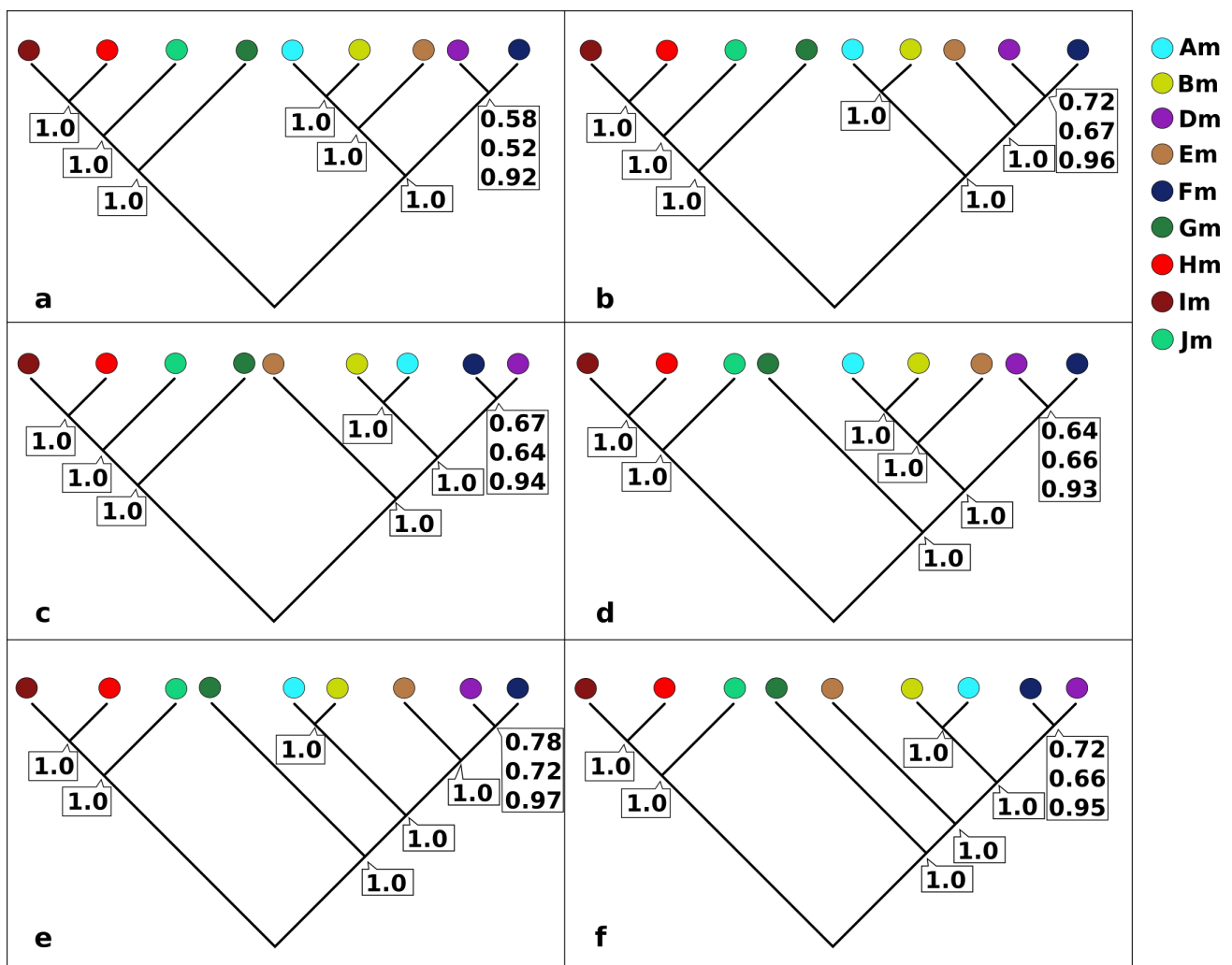


variando de  $K = 1-14$  para cada clado basal são mostrados na direita. Os números das localidades estão especificados na Tabela 1.



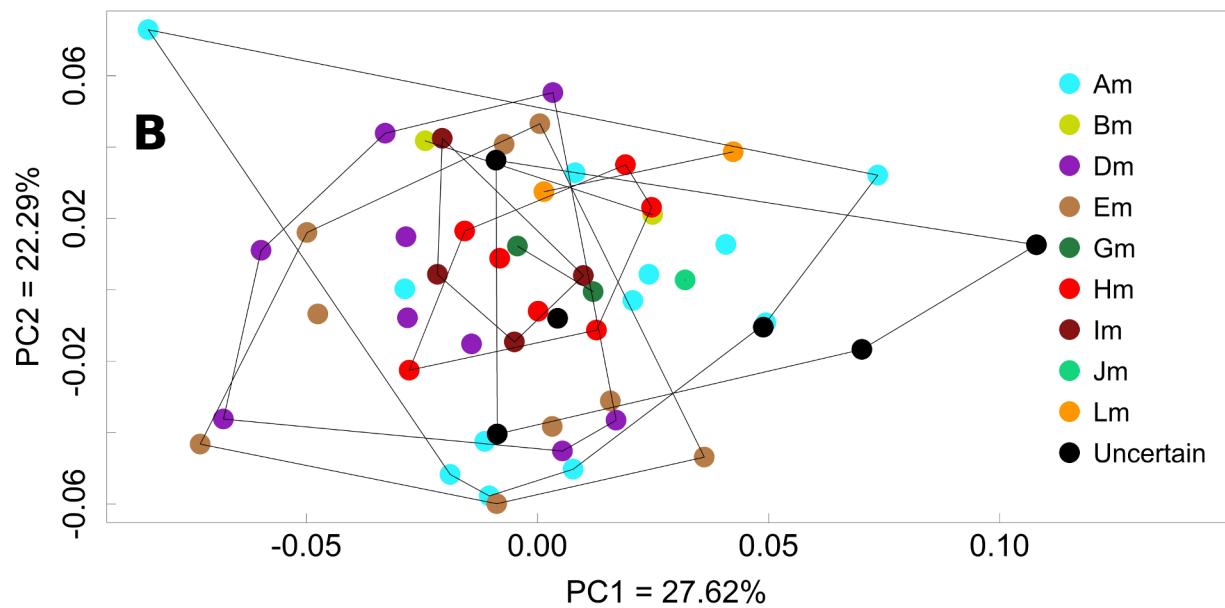
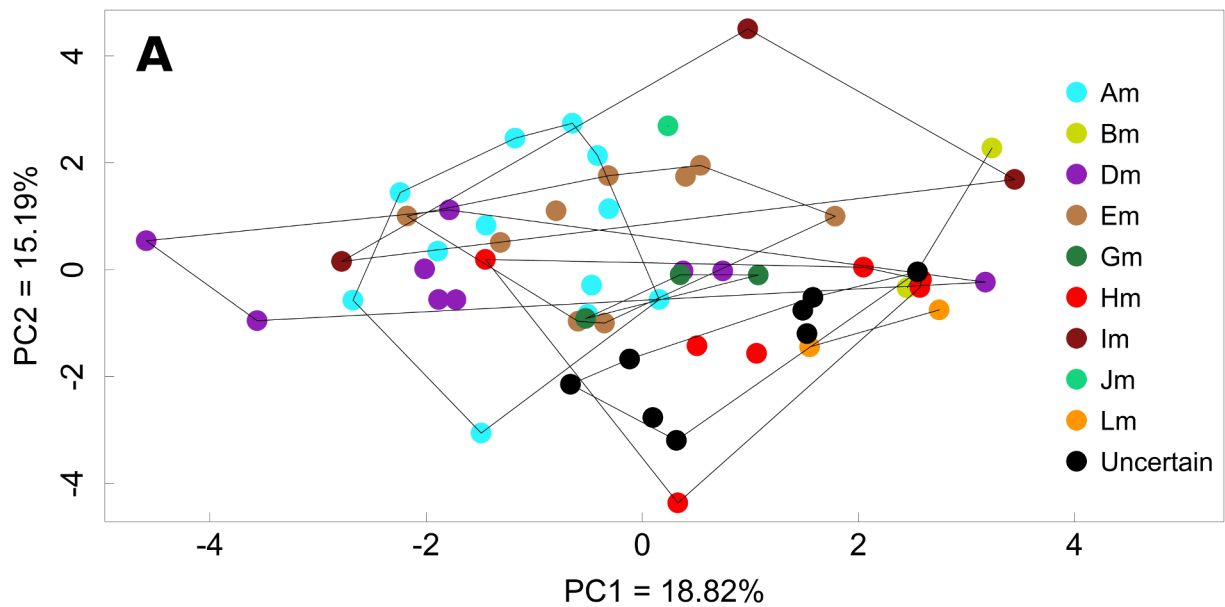
**Figure 9.** Multilocus network baseadas em distâncias genéticas entre as amostras de *Loxopholis osvaldoi* baseadas em dois marcadores nucleares analisados (NT3 and

KIAA2018). Amostras foram coloridas de acordo com a classificação obtida no STRUCTURE. Localidades amostradas estão representadas na Tabela 1 e Figura 5.

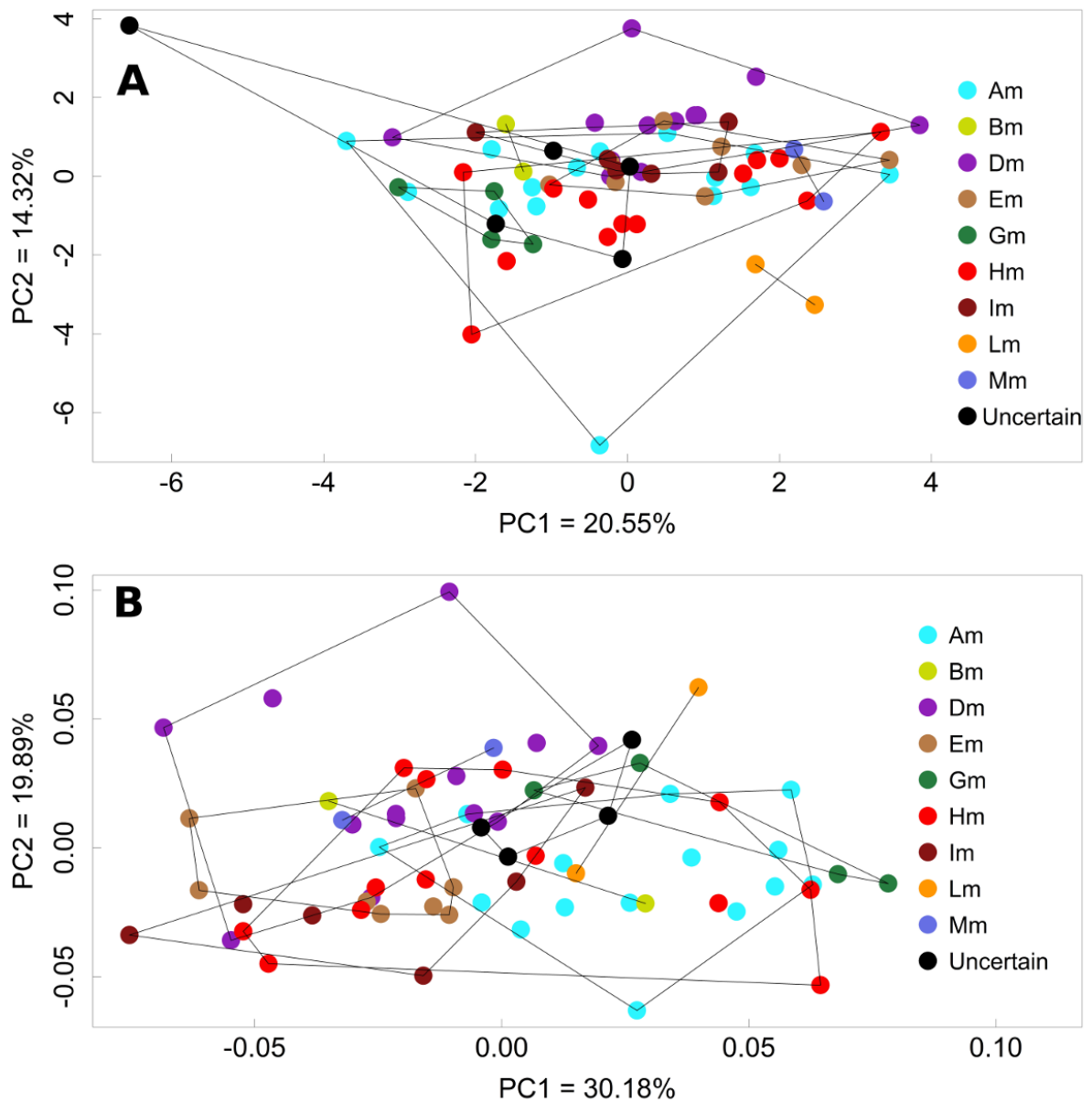


**Figure 10.** Resultados do BPP. figuras de A – F representam as diferentes topologias usadas. Números dentro dos quadrados mostram os valores de PP para o evento de especiação representado por aquele nó. Os terminais foram agrupados e coloridos de acordo com os resultados da filogenia mtDNA. Para fins de simplificação, resultados de PP iguais para cada configuração de *priors* (ver texto) são mostrados como valores únicos (i.e. quadrados com valor 1,0). Valores diferentes dentro do mesmo quadrado mostram os diferentes resultados de PP na seguinte ordem (de cima para baixo): *priors* especificando tamanhos populacionais ancestrais grandes e divergências antigas ( $\theta_s = \tau_s = G(1,10)$ ); populações ancestrais grandes ( $\theta_s = G(1,10)$ ) e tempos de divergência

rasos ( $\tau_s = G(2, 2000)$ ); populações ancestrais pequenas e tempos de divergência rasos ( $\theta_s = \tau_s = G(2, 2000)$ ).



**Figure 11.** Gráfico de dispersão dos scores dos espécimes analisados no primeiro e segundo eixos (PC) da Análise de Componentes Principais (PCA) de 61 fêmeas de *Loxopholis osvaldoi* baseado em 16 variáveis merísticas (A) e 11 variáveis morfométricas (B).



**Figure 12.** Gráfico de dispersão dos scores dos espécimes analisados no primeiro e segundo eixos (PC) da Análise de Componentes Principais (PCA) de 80 machos de *Loxopholis osvaldoi* baseado em 16 variáveis merísticas (A) e 11 variáveis morfométricas (B).

### 3.7. Tabelas

**Tabela 1.** Localidades amostradas nas análises moleculares e informação haplotípica para os fragmentos de genes nucleares.

Haps: Haplotipos; Hd: Diversidade de haplótipos por localidade, ver texto para maiores detalhes.

SL	Locality	State	Lat	Long	MitDNA group	N	Haps NT3 (N)	Corrected Hd NT3	Shared haps NT3	Haps KIAA (N)	Corrected Hd KIAA	Shared haps KIAA
1	FLOTA Faro	PA	-1.71401	-57.21330	Am	3	1-3 (3)	-0.33	0%	1 (1)	-1.90	0%
2	São João do Lago da Velha, margem direita Rio Jatapú	AM	-2.03814	-58.23213	Am	5	4-7 (4)	-1.01	0%	2-5 (4)	-0.53	50%
3	Anavilhanas, Terra Firme	AM	-2.48868	-60.87640	Am	1	8 (1)	-0.64	0%	6 (1)	-0.27	0%
4	PAREST Cuieiras, margem esquerda Rio Negro	AM	-2.78333	-60.45000	Am	3	9-11 (3)	-0.33	33%	2,5,7-9 (5)	2.10	40%
5	Itapiranga	AM	-2.74111	-58.17722	Am	1	9,12 (2)	0.36	50%	-	-	-
6	Silves	AM	-2.70444	-58.24944	Am	1	13,14 (2)	0.36	0%	10 (1)	-0.27	0%
7	Jurutí	PA	-2.60944	-56.19611	Dm	2	15-18 (4)	1.52	0%	11-13 (3)	0.92	67%
8	PARNA Amazônia, P4	PA	-3.97308	-55.61933	Dm	2	9,19,20,21 (4)	1.52	50%	11,14,15 (3)	0.92	67%
9	PARNA Amazônia, P3	PA	-3.91106	-55.53247	Dm	1	21,22 (2)	0.36	50%	15 (1)	-0.27	100%
10	PARNA Amazônia, acampamento-base	PA	-4.67417	-56.54778	Dm	1	23,24 (2)	0.36	0%	12,16 (2)	0.73	50%
11	FLONA do Trairão	PA	-4.61695	-55.47742	Fm	2	25 (1)	-1.48	0%	17,18 (2)	-0.08	0%
12	Maués, São Tomé. Igarapé Tabacal. Rio Paraconi	AM	-3.94722	-58.44333	Bm	2	26-29 (4)	1.52	25%	19,20 (2)	-0.08	0%
13	Igarapé Açú, margem direita Rio Abacaxis	AM	-4.34417	-58.63500	Bm	11	27,30-39 (11)	0.93	9%	5,21-38 (19)	9.57	5%
14	Pacamiri, margem direita Rio Abacaxis	AM	-4.59694	-58.22056	Bm	2	40-42 (3)	0.52	0%	39,40 (2)	-0.08	0%
15	São Sebastião, margem esquerda Rio Abacaxis	AM	-4.30889	-58.63639	Cm	3	43-47 (5)	1.67	0%	41-45 (5)	2.10	0%
16	Palhalzinho, margem esquerda Rio Abacaxis	AM	-4.30889	-58.63639	Cm	1	48-49 (2)	0.36	0%	46,47 (2)	0.73	0%
17	São Sebastião dos Bargas, Margem direita rio Madeira	AM	-3.78986	-59.03521	Jm	1	50 (1)	-0.64	0%	48,49 (2)	0.73	0%
18	Fazenda Walmir, Vila Sampaio, Margem Esquerda rio Madeira, Autazes	AM	-3.71423	-59.14377	Em	4	51-54 (4)	-0.17	50%	50-56 (7)	3.28	0%
19	Lago Chaviana, margem direita Rio Purus	AM	-4.30775	-61.81375	Em	4	55-58 (4)	-0.17	25%	57 (1)	-2.72	0%



20	Moiobamba, margem direita, Rio Purus	AM	-4.72708	-62.12919	Im	6	57,59-64 (7)	1.14	29%	58-63 (6)	0.65	33%
21	Cachoeirinha, margem esquerda Rio Madeira	AM	-5.48940	-60.83440	Em	10	51,52,65-69 (7)	-2.23	29%	64-66 (3)	-5.62	0%
22	Itapinima, Margem Direita Rio Madeira	AM	-5.41060	-60.72720	Em	1	52,70 (2)	0.36	50%	67 (1)	-0.27	0%
23	Santa Maria, margem esquerda rio Aripuanã	AM	-5.79778	-60.26528	Hm	2	71,72 (2)	-0.48	0%	58,68,69 (3)	0.92	33%
24	Lago Cipotuba, Margem Direita Rio Aripuanã	AM	-5.80139	-60.22111	Jm	3	73-78 (6)	2.67	0%	70-74 (5)	2.10	-
25	São José das Pombas, Margem Esquerda Rio Aripuanã	AM	-6.41667	-60.36667	Im	7	57,62,79-86 (10)	3.30	20%	75-80 (6)	-0.17	0%
26	Cachoeira das Pombas, Margem direita Rio Aripuanã	AM	-6.40000	-60.35000	Fm,Hm	7	87-97 (11)	4.30	0%	81-90 (10)	3.83	0%
27	Tapauá, Igarapé do Jacinto, margem direita Rio Purus	AM	-5.70140	-63.20395	Im	6	98-104 (7)	1.14	43%	58,62,91,92 (4)	-1.35	50%
28	Jacareacanga	PA	-6.32	-57.64	Nm	2	105-107 (3)	0.52	0%	93,94 (2)	-0.08	0%
29	Itaituba, Mina do Tocantinzinho	PA	-6.04583	-56.30361	Mm	3	108,109 (2)	-1.33	0%	95,96 (2)	-0.90	0%
30	Novo Progresso, BR-163	PA	-7.15778	-55.93583	Lm	1	110,111 (2)	0.36	0%	97 (1)	-0.27	0%
31	Projó, margem direita rio Aripuanã	AM	-7.62049	-60.66989	Hm	2	112,113 (2)	-0.48	0%	98,99 (2)	-0.08	0%
32	Projó, margem esquerda rio Aripuanã	AM	-7.63818	-60.66912	Gm	2	114,115 (2)	-0.48	0%	100-102 (3)	0.92	33%
33	Abunã, margem esquerda Rio Madeira	RO	-9.64028	-65.44000	Im	3	100,116-119 (5)	1.67	20%	60,62 (2)	-0.90	100%
34	Abunã, margem direita rio Madeira	RO	-9.59750	-65.36750	Im	2	99,101,120 (3)	0.52	67%	62 (1)	-1.08	100%
35	Mutum, margem esquerda rio Madeira	RO	-9.59139	-65.04917	Im	1	99 (1)	-0.64	100%	-	-	-
36	Caiçara, margem esquerda Rio Madeira	RO	-9.44583	-64.82472	Im	5	99,117,121-123 (5)	-0.01	40%	60,62,103 (3)	-1.53	67%
37	PAREST Guajará-Mirim	RO	-10.52556	-64.51083	Gm	1	124 (1)	-0.64	100%	104,105 (2)	0.73	50%
38	PARNA Pacaás Novos, base Jaci	RO	-10.53417	-63.97278	Gm	2	124,125 (2)	-0.48	100%	104 (1)	-1.08	100%
39	PARNA Pacaás Novos	RO	-10.76139	-63.61972	Gm	5	124,125 (2)	-3.01	100%	104,106-108 (4)	-0.53	25%
40	Monte Negro	RO	-10.28306	-63.31667	Gm	5	124,126,127 (3)	-2.01	33%	104 (1)	-3.53	100%
41	Aripuanã Oeste	MT	-9.86042	-60.26306	Gm	2	128 (1)	-1.48	0%	100,109 (2)	-0.08	50%
42	Aripuanã, margem esquerda Rio Aripuanã	MT	-10.29583	-59.54722	Hm	5	129-131 (3)	-2.01	0%	-	-	-

43	Aripuanã, margem direita Rio Aripuanã	MT	-10.27194	-59.38833	Hm	2	132-133 (2)	-0.48	50%	-	-	-
44	Colniza	MT	-9.41083	-59.02278	Gm,Hm	10	132,134-142 (10)	0.77	20%	100,110-114 (6)	-2.62	17%
45	Juruena	MT	-10.23694	-58.49083	Gm,Hm	6	132,138,143 (3)	-2.86	67%	113,115-118 (5)	-0.35	40%
46	Cotriguaçu	MT	-9.80000	-58.26667	Hm	1	132,144 (2)	0.36	50%	113,115 (2)	0.73	100%
47	Apiacás	MT	-9.56778	-57.34278	Hm	6	132,136,145 (3)	-2.86	67%	113 (1)	-4.35	100%
48	Paranaíta	MT	-9.59444	-56.68222	Hm	1	136,146 (2)	0.36	50%	-	-	-
49	BR319	AM	?	?	Im	1	147 (1)	-0.64	0%	-	-	-
<b>Total</b>						<b>160</b>						

**Tabela 2.** Amostras usadas nas análises moleculares. 'X' representa que a amostra foi sequenciada com sucesso para o referido gene. SL: localidade amostrada.

ID	Voucher	SL	Haplogroup	Code	ND4	CYTB	NT3	KIAA2018
1	125	04	Am	125_SL04	X	X	X	X
2	126	04	Am	126_SL04	X		X	
3	127	04	Am	127_SL04	X	X	X	X
4	138	04	Am	138_SL04			X	X
5	967938	43	Hm	967938_SL43		X		
6	967994	43	Hm	967994_SL43		X	X	
7	968242	47	Hm	968242_SL47	X	X	X	
8	968292	47	Hm	968292_SL47	X	X	X	X
9	968401	47	Hm	968401_SL47			X	X
10	968464	47	Hm	968464_SL47	X	X	X	X
11	976911	45	Hm	976911_SL45	X	X	X	
12	977048	45	Hm	977048_SL45	X	X	X	X
13	977154	45	Hm	977154_SL45	X	X	X	X
14	977176	45	Gm	977176_SL45	X	X	X	X
15	977404	42	Hm	977404_SL42	X	X	X	
16	977709	42	Hm	977709_SL42	X	X	X	X
17	MTR19417	20	Im	MTR19417_SL20	X		X	X
18	BR319-475	49	Im	BR319-475_SL49	X		X	
19	CTGAL029	02	Am	CTGAL029_SL02	X		X	X
20	CTGAL036	02	Am	CTGAL036_SL02	X	X	X	X
21	CTGAL075	02	Am	CTGAL075_SL02	X	X	X	X
22	CTGAL117	02	Am	CTGAL117_SL02	X		X	X
23	CTGAL121	02	Am	CTGAL121_SL02	X	X	X	
24	CTGAL295	27	Im	CTGAL295_SL27	X	X	X	X
25	CTGAL298	27	Im	CTGAL298_SL27	X		X	
26	CTGAL315	27	Im	CTGAL315_SL27	X		X	X
27	CTGAL354	27	Im	CTGAL354_SL27	X		X	X
28	CTGAL356	27	Im	CTGAL356_SL27	X		X	
29	CTGAL377	27	Im	CTGAL377_SL27	X		X	
30	CTMZ6313	28	Nm	CTMZ6313_SL28	X	X	X	X
31	CTMZ6337	28	Nm	CTMZ6337_SL28	X	X	X	X
32	H1448	33	Im	H1448_SL33	X	X	X	X
33	LSU17807	37	Gm	LSU17807_SL37	X		X	X
34	H2781	36	Im	H2781_SL36	X	X	X	X
35	H2816	33	Im	H2816_SL33			X	

36	H0770	36	Im	H0770_SL36	X		X	X
37	H0946	33	Im	H0946_SL33	X	X	X	X
38	LG1221	47	Hm	LG1221_SL47	X	X	X	X
39	LG1790	40	Gm	LG1790_SL40	X	X	X	X
40	LG2103	40	Gm	LG2103_SL40			X	
41	MPEG20788	07	Dm	MPEG20788_SL07	X	X	X	X
42	MPEG20827	07	Dm	MPEG20827_SL07	X	X	X	X
43	MPEG22276	10	Dm	MPEG22276_SL10	X	X	X	X
44	MPEG27219	01	Am	MPEG27219_SL01	X	X	X	X
45	MPEG27220	01	Am	MPEG27220_SL01	X	X	X	X
46	MPEG27221	01	Am	MPEG27221_SL01	X	X	X	
47	MPEG27646	12	Bm	MPEG27646_SL12		X	X	X
48	MPEG27647	12	Bm	MPEG27647_SL12	X	X	X	X
49	MPEG28449	30	Lm	MPEG28449_SL30	X	X	X	X
50	MPEG29054	29	Mm	MPEG29054_SL29		X	X	X
51	MPEG29055	29	Mm	MPEG29055_SL29	X	X	X	X
52	MPEG29057	29	Mm	MPEG29057_SL29	X	X	X	X
53	MSH10328	03	Am	MSH10328_SL03	X	X	X	X
54	MTR10012	24	Jm	MTR10012_SL24	X	X	X	X
55	MTR10025	24	Jm	MTR10025_SL24	X	X	X	X
56	MTR10035	24	Jm	MTR10035_SL24	X	X	X	X
57	MTR10058	23	Hm	MTR10058_SL23	X	X	X	X
58	MTR10102	23	Hm	MTR10102_SL23	X	X	X	X
59	MTR10141	26	Gm	MTR10141_SL26	X	X		X
60	MTR10150	26	Hm	MTR10150_SL26	X	X	X	X
61	MTR10153	26	Gm	MTR10153_SL26	X	X	X	X
62	MTR10158	25	Im	MTR10158_SL25	X	X	X	X
63	MTR10170	26	Hm	MTR10170_SL26	X	X	X	X
64	MTR10192	25	Im	MTR10192_SL25	X	X	X	
65	MTR10193	25	Im	MTR10193_SL25	X	X	X	
66	MTR10194	25	Im	MTR10194_SL25	X	X	X	X
67	MTR10195	25	Im	MTR10195_SL25			X	X
68	MTR10196	25	Im	MTR10196_SL25		X	X	X
69	MTR10197	25	Im	MTR10197_SL25	X	X	X	X
70	MTR10211	26	Hm	MTR10211_SL26	X	X	X	X
71	MTR10237	26	Hm	MTR10237_SL26		X	X	X
72	MTR10238	26	Hm	MTR10238_SL26	X	X	X	X
73	MTR12735	13	Bm	MTR12735_SL13	X	X	X	X
74	MTR12736	13	Bm	MTR12736_SL13	X	X	X	X
75	MTR12737	13	Bm	MTR12737_SL13	X	X	X	X

76	MTR12739	13	Bm	MTR12739_SL13	X	X	X	X
77	MTR12764	13	Bm	MTR12764_SL13		X	X	X
78	MTR12765	13	Bm	MTR12765_SL13	X	X	X	X
79	MTR12769	13	Bm	MTR12769_SL13	X	X	X	X
80	MTR12807	13	Bm	MTR12807_SL13	X	X	X	X
81	MTR12816	13	Bm	MTR12816_SL13	X	X	X	X
82	MTR12822	15	Cm	MTR12822_SL15	X	X	X	X
83	MTR12858	15	Cm	MTR12858_SL15	X	X	X	X
84	MTR12864	15	Cm	MTR12864_SL15	X	X	X	X
85	MTR12874	13	Bm	MTR12874_SL13	X	X	X	X
86	MTR12888	13	Bm	MTR12888_SL13	X	X	X	X
87	MTR13128	14	Bm	MTR13128_SL14	X	X	X	X
88	MTR13203	14	Bm	MTR13203_SL14	X	X	X	X
89	MTR13266	16	Cm	MTR13266_SL16	X	X	X	X
90	MTR18712	19	Em	MTR18712_SL19	X	X	X	X
91	MTR18713	19	Em	MTR18713_SL19	X	X	X	
92	MTR18803	19	Em	MTR18803_SL19	X	X	X	
93	MTR18970	19	Em	MTR18970_SL19	X	X	X	X
94	MTR19060	20	Im	MTR19060_SL20	X		X	X
95	MTR19090	20	Im	MTR19090_SL20	X	X	X	X
96	MTR19179	20	Im	MTR19179_SL20	X	X	X	X
97	MTR19425	20	Im	MTR19425_SL20	X		X	
98	MTR19428	20	Im	MTR19428_SL20	X	X	X	X
99	MTR25527	39	Gm	MTR25527_SL39	X		X	X
100	MTR25652	39	Gm	MTR25652_SL39	X		X	X
101	MTR25683	39	Gm	MTR25683_SL39	X		X	X
102	MTR25940	39	Gm	MTR25940_SL39	X	X	X	X
103	MTR25949	39	Gm	MTR25949_SL39	X		X	X
104	MTR25989	38	Gm	MTR25989_SL38	X		X	X
105	MTR25995	38	Gm	MTR25995_SL38	X		X	X
106	PG12	46	Hm	PG12_SL46	X	X	X	X
107	PRMT153	09	Dm	PRMT153_SL09	X	X	X	X
108	PRMT228	08	Dm	PRMT228_SL08		X	X	X
109	PRMT234	08	Dm	PRMT234_SL08		X	X	X
110	RCV2222	21	Em	RCV2222_SL21		X	X	
111	RCV2249	22	Em	RCV2249_SL22		X	X	X
112	RF81	06	Am	RF81_SL06	X	X	X	X
113	SMS024	32	Gm	SMS024_SL32	X	X	X	X
114	SMS030	32	Gm	SMS030_SL32		X	X	X
115	SMS039	31	Hm	SMS039_SL31		X	X	X

116	SMS349	11	Fm	SMS349_SL11	X	X	X	X
117	SMS424	11	Fm	SMS424_SL11			X	X
118	SMS602	17	Jm	SMS602_SL17	X	X	X	X
119	SMS698	18	Em	SMS698_SL18	X	X	X	X
120	SMS699	18	Em	SMS699_SL18	X	X	X	X
121	SMS718	18	Em	SMS718_SL18	X	X	X	X
122	SMS719	18	Em	SMS719_SL18		X	X	X
123	UNIBAN1662	40	Gm	UNIBAN1662_SL40		X	X	X
124	UNIBAN1702	40	Gm	UNIBAN1702_SL40		X	X	X
125	UNIBAN1812	40	Gm	UNIBAN1812_SL40				X
126	VOGT2156	21	Em	VOGT2156_SL21		X	X	X
127	VOGT2157	21	Em	VOGT2157_SL21		X	X	X
128	VOGT2161	21	Em	VOGT2161_SL21	X	X	X	X
129	VOGT2162	21	Em	VOGT2162_SL21		X		
130	VOGT2163	21	Em	VOGT2163_SL21		X	X	
131	VOGT2164	21	Em	VOGT2164_SL21	X	X	X	
132	VOGT2165	21	Em	VOGT2165_SL21		X		
133	VOGT2167	21	Em	VOGT2167_SL21	X	X	X	
134	VOGT2215	21	Em	VOGT2215_SL21		X	X	
135	RMT200	44	Gm	RMT200_SL44	X	X	X	
136	PMJ234	44	Hm	PMJ234_SL44	X	X	X	
137	GARI72	41	Gm	GARI72_SL41	X	X	X	X
138	RMT107	44	Gm	RMT107_SL44	X	X	X	
139	ARI354	41	Gm	ARI354_SL41			X	
140	PMJ17	44	Hm	PMJ17_SL44	X	X	X	X
141	RMT106	44	Gm	RMT106_SL44	X		X	
142	PMJ235	44	Hm	PMJ235_SL44	X	X	X	
143	RMT020	44	Gm	RMT020_SL44	X	X	X	X
144	RMT055	44	Gm	RMT055_SL44	X	X	X	X
145	RMT071	44	Gm	RMT071_SL44	X	X	X	X
146	PMJ236	44	Hm	PMJ236_SL44	X	X		X
147	977712	42	Hm	977712_SL42	X	X	X	
148	H4162	35	Im	H4162_SL35	X		X	
149	UFA537	48	Hm	UFA537_SL48			X	
150	RF10	05	Am	RF10_SL05	X	X	X	
151	H2941	36	Im	H2941_SL36	X		X	
152	977155	45	Hm	977155_SL45	X	X	X	
153	976913	45	Hm	976913_SL45	X	X	X	X
154	H3433	34	Im	H3433_SL34	X	X	X	
155	H4698	36	Im	H4698_SL36	X		X	X

156	H4752	36	Im	H4752_SL36	X	X	X
157	H4073	34	Im	H4073_SL34	X	X	X
158	UFA573	47	Hm	UFA573_SL47		X	
159	SMS016	31	Hm	SMS016_SL31	X		

**Tabela 3.** Estatísticas demográficas para cada gene analisado e para o mtDNA concatenado, este último para toda a amostra e separado pelos grupos mtDNA recuperados na análise filogenética. N: Numero de amostras; loc: número de localidades amostradas; H: número de haplótipos; Hd: diversidade haplotípica;  $\theta_w$ : estimador de Watterson por sequência; Pi: diversidade nucleotídica por sítio; k: número médio de diferenças fenotípicas por sequência; S: sítios segregantes; Fu & Li's F\*: estatística do teste de neutralidade intraespecífico Fu and Li's.

Gene	bp	N/loc	H/Hd	$\theta_w$	Pi(%) / k	S	Fu & Li's F*
CytB	416	114/40	74/0.99	37.48	11.4 / 38.65	141	0.37
ND4	670	126/44	80/0.98	55.09	10.5 / 50.55	223	0.16
NT3 (phased)	647	259/48	147/0.99	18.59	1.3 / 8.64	104	*-2.96
KIAA2018 (phased)	617	185/43	118/0.99	20.2	1.4 / 8.72	107	*-2.60
mitDNA combined	1086	91/36	67/0.99	92.47	10.9 / 89.55	348	0.16
<b>mitDNA polymorphism for mitochondrial groups</b>							
Am	1086	10/6	8/0.95	58.67	6.6 / 62.35	161	-
Bm	1086	12/3	10/0.97	31.12	2.8 / 27.25	91	-
Cm	1086	4/2	2/0.5	2.72	0.2 / 2.5	5	-
Dm	1086	4/2	3/0.83	33.27	3.6 / 38.33	61	-
Em	1086	10/3	4/0.78	24.03	2.9 / 30.51	66	-
Gm	1086	9/7	9/1.0	44.15	4.4 / 44.27	114	-
Hm	1086	23/7	19/0.98	39.01	4.2 / 39.62	136	-
Im	1086	10/4	5/0.822	31.81	3.9 / 38.84	90	-
Jm	1086	4/2	4/1.0	35.45	3.0 / 33.5	64	-

#### 4. Considerações finais

O gênero *Loxopholis* possui uma antiga história no norte da América do Sul, iniciando sua diversificação durante o Oligoceno, conforme indicado por profundas divergências moleculares. No entanto, a variação morfológica encontrada não reflete essa longa história. No geral, as espécies diferem principalmente pelo tamanho corporal e alguns caracteres merísticos e categóricos, e a taxonomia atual, realizada primariamente com base na morfologia, foi corroborada pela hipótese filogenética apresentada aqui, apesar de subestimar a diversidade do grupo graças a morfologia conservada. As espécies podem ser classificadas em três categorias de acordo com os padrões de distribuição: espécies da bacia amazônica, norte da Venezuela cis-andina, e trans-andinas. As espécies da bacia amazônica estão distribuídas em um eixo leste-oeste. Esse padrão provavelmente reflete o papel vicariante dos arcos estruturais (terras altas) que estiveram presentes na bacia amazônica ao longo do Neogeno, principalmente os arcos de Iquitos, Purus e Monte Alegre, que atuaram na diversificação das espécies *L. parietalis*, *L. snethlageae*, *L. guianense* e *L. osvaldoi*. Além disso, o Lago Pebas Miocênico, assim como incursões marinhas, também possuíram um papel importante na diversificação de *Loxopholis*, principalmente na divergência do clado formado por *L. percarinatum*, *L. ferreirai* e *L. hexalepis*, espécies que evoluíram para a vida em ambientes aquáticos. Rios e refúgios florestais pleistocênicos tiveram um papel apenas na estruturação genética intraespecífica (de acordo com a taxonomia atual), se tiveram algum papel de fato. Por fim, a expansão de *L. rugiceps* através do Istmo do Panamá é congruente com estimativas recentes (c.a. 3-4 Ma).

Diversas espécies apresentaram evidências de uma grande diversidade intraespecífica, como *L. guianense*, *L. parietalis*, *L. snethlageae*, *L. rugiceps* e *L. osvaldoi*. Esta última foi estudada em detalhes a partir de uma análise filogeográfica abrangendo quase toda a distribuição da espécie, mostrando uma profunda divergência genética iniciada no Mioceno, e as linhagens mostrando um intrincado padrão de distribuição na Amazônia Central. Em relação a taxonomia, nossos dados moleculares



sugerem que 8 a 14 espécies estejam envolvidas no complexo de espécies *L. osvaldoi*, no entanto, não conseguimos realizar a diagnose morfológica destas potenciais espécies. No geral, a morfologia de *Loxopholis* se mostrou bastante conservada, de forma que os resultados apresentados na descrição das populações bissexuais de *L. percarinatum* (artigo Apêndice 1) devem ser observados com cautela em relação a taxonomia, ainda mais com o potencial efeito complicador do surgimento da partenogênese.

Desse modo, espero ter contribuído para revelar que a história evolutiva do gênero *Loxopholis* no norte da América do Sul representa uma antiga história, muito mais antiga do que a hipotetizada por nós durante o início deste estudo. Confirmamos aqui a previsão inicial de que esse lagarto possui um incrível potencial para rastrear as mudanças da paisagem Amazônica ao longo do tempo evolutivo. Mais interessante ainda, a história evolutiva de *Loxopholis* abre uma janela para o pouco conhecido período Neogeno na América do Sul, oportunidade rara uma vez que a maioria dos grupos amazônicos estudados divergiram entre os períodos Mioceno a Pleistoceno (TURCHETTO-ZOLET *et al.*, 2012). Por exemplo, uma amostragem mais ampla das espécies *L. rugiceps* e *L. southi* (assim como as espécies não amostradas aqui, *L. caparensis* e *L. ioanna*) pode confirmar a expectativa de um agrupamento trans-andino monofilético e fornecer uma datação importante para o soerguimento dos Andes Central e Norte. Mesmo em tempos recentes (i.e. Mioceno a Pleistoceno), um estudo mais detalhado da divergência intraespecífica das espécies amazônicas pode revelar detalhes antes não apreciados da história das paisagens amazônicas, como sugere o complexo padrão de distribuição das potenciais espécies do complexo *L. osvaldoi*. No entanto, essas questões permanecem em aberto para futuros estudos.

## Resumo Geral

A Amazônia abriga uma grande parcela da biodiversidade mundial, no entanto, existem grandes incertezas sobre os processos de geração e manutenção dessa enorme diversidade, com várias hipóteses propostas até o momento. Diversas características como tamanho pequeno, baixa capacidade de dispersão e fidelidade ao ambiente estritamente florestal fazem de lagartos do gênero *Loxopholis* (Squamata: Gymnophthalmidae) candidatos ideais para rastrear a história de modificações da paisagem no norte da América do Sul durante o Neogeno. Nesta tese, revisamos a variação morfológica, taxonomia e a distribuição geográfica das espécies do gênero *Loxopholis*, assim como estimamos as relações filogenéticas e o tempo de divergência entre as espécies com base em sequências de DNA provenientes do genoma mitocondrial e nuclear. Com essa base de dados, construímos um modelo de como ocorreu a história evolutiva de *Loxopholis*, discutindo os resultados a partir de reconstruções geológicas provenientes da literatura, e fornecendo uma datação independente para eventos geológicos que potencialmente influenciaram a história evolutiva do gênero. Neste estudo, também revelamos que a atual diversidade descrita para *Loxopholis* está severamente subestimada. Encontramos que a espécie *L. osvaldoi* representa um complexo de espécies crípticas, contendo de 8 a 14 potenciais espécies novas, com profundas divergências genéticas tanto nos genomas mitocondrial e nuclear, praticamente dobrando a diversidade conhecida no gênero. No entanto, a morfologia em *Loxopholis* é extremamente conservada, dificultando a diagnose das espécies novas. Finalmente, descrevemos a primeira população bissexual da espécie partenogenética *L. percarinatum*, discutindo as implicações deste achado para o entendimento relativo a aparição da partenogênese em *Loxopholis*.

## General abstract

The Amazon rainforest houses a significant portion of the world biodiversity, however, there is still a lot of uncertainty about the processes involved in its generation and maintenance, with several hypotheses proposed so far. *Loxopholis* lizards (Squamata: Gymnophthalmidae) are small-sized; show low vagility, and high fidelity to

the humid forest environment, making them ideal to test hypotheses on the history of landscape modifications in Northern South America, during the Neogene. In this thesis, we revise the morphological variation, the taxonomy, and the geographic distribution of *Loxopholis* species, as well as estimated a phylogenetic hypothesis and divergence times for these species based on sequences from mitochondrial and nuclear DNA. With this dataset, we build a model for the evolutionary history of *Loxopholis* and compared the results with geologic reconstructions of the Amazon available in the literature, which provided independent time estimates for geological events that potentially affected the evolutionary history of genus. In this study, we also showed that the actual diversity described for *Loxopholis* was severely underestimated. We found that *L. osvaldoi* represents a complex of cryptic species with 8-14 potential new species, and strong divergences in both the mitochondrial and the nuclear genomes, virtually doubling the actual diversity in the genus. Finally, we describe the first bisexual population for the parthenogenetic species *L. percarinatum*, discussing its implications to the origin of parthenogenesis in the genus.

## **5. Apêndices**



## **Apêndice 1**

**Artigo: “ On the Discovery of Bisexual Populations of the Parthenogenetic Lizard *Leposoma percarinatum* (Gymnophthalmidae), with Insights into the Origin of Parthenogenesis in *Leposoma*” Publicado na revista *South American Journal of Herpetology* 10(2): 121-131. 2015**

# On the Discovery of Bisexual Populations of the Parthenogenetic Lizard *Leposoma percarinatum* (Gymnophthalmidae), with Insights into the Origin of Parthenogenesis in *Leposoma*

Sergio Marques Souza<sup>1,\*</sup>, Katia C.M. Pellegrino<sup>2</sup>, Pedro M. Sales Nunes<sup>3</sup>, Mauro Teixeira Junior<sup>1</sup>, Marcelo Gordo<sup>4</sup>, Vinícius T. de Carvalho<sup>5</sup>, Alexandre Almeida<sup>4</sup>, Deyla Paula de Oliveira<sup>5</sup>, Luciana Frazão<sup>4</sup>, Tomas Hrbek<sup>5</sup>, Izeni Pires Farias<sup>5</sup>, Miguel Trefaut Rodrigues<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, Departamento de Zoologia. Rua do Matão, Travessa 14, nº 32, Butantã, CEP 05508-090, São Paulo, SP, Brazil.

<sup>2</sup> Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Ciências Biológicas. Rua Professor Arthur Riedel, 275, Eldorado, CEP 09972-270, Diadema, SP, Brazil.

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Zoologia, Centro de Ciências Biológicas. Avenida Professor Moraes Rego, s/n., Cidade Universitária, CEP 50670-901, Recife, PE, Brazil.

<sup>4</sup> Universidade Federal do Amazonas, Departamento de Biologia. Avenida Rodrigo Otávio, 3.000, Japiim, CEP 69080-900, Manaus, AM, Brazil.

<sup>5</sup> Universidade Federal do Amazonas, Departamento de Genética, Laboratório de Evolução e Genética Animal. Avenida Rodrigo Otávio, 3.000, Japiim, CEP 69080-900, Manaus, AM, Brazil.

\* Corresponding author. Email: sergio.bogao@gmail.com

**Abstract.** *Leposoma percarinatum* is one of the two recognized parthenogenetic species in the lizard family Gymnophthalmidae, and only females have been reported to date. Here we report and describe the first known males attributed to the species from two localities of north-western Amazonia. We compare the morphological variation (15 meristic and 10 discrete characters, all relevant to species identification in *Leposoma*) of males and females from these populations with that of specimens from unisexual populations to test the hypothesis that they belong to the same species. We did not find significant morphological differences between unisexual and bisexual populations, except for those associated with sexual dimorphism. Additionally, we reviewed literature dealing with the origin of parthenogenesis in *L. percarinatum* and we provide some insights into this subject, in view of the discovery of males in this species.

**Keywords.** Amazonia; Hybridization; Lizards; Unisexuality.

**Resumo.** *Leposoma percarinatum* é uma das duas espécies de lagartos partenogenéticas da família Gymnophthalmidae, onde apenas fêmeas são conhecidas até o momento. Neste artigo reportamos e descrevemos os primeiros machos encontrados da espécie, pertencentes a duas populações no noroeste da América do Sul. Com o intuito de testar a hipótese de que os machos encontrados pertencem à espécie *L. percarinatum*, comparamos a variação morfológica (15 caracteres merísticos e 10 categóricos, todos relevantes para a identificação de espécies do gênero *Leposoma*) encontrada em machos e fêmeas das duas populações bissexuais com exemplares de populações unissexuais ao longo da Amazônia. Não encontramos diferenças significativas na morfologia entre populações uni e bissexuais, a não ser aquelas decorrentes de dimorfismo sexual tradicionalmente conhecidas em lagartos. Adicionalmente, revisamos a literatura referente à origem da partenogênese em *L. percarinatum* e fornecemos algumas reflexões sobre este tópico, fruto do aparecimento de machos na espécie.

## INTRODUCTION

Sex is by far the primary mode of reproduction of multicellular organisms, given the evolutionary advantage of genetic recombination (Felsenstein, 1974; Maynard-Smith, 1978). However, every rule has its exceptions; hence, the occurrence of parthenogenesis in lizards (i.e. the development of embryos without fertilization) has long fascinated evolutionary biologists (e.g. Zweifel, 1965). Lizards harbor the only truly parthenogenetic vertebrate species known, in which populations of all-female individuals reproduce without the involvement of males (MacCulloch *et al.*, 1997; Kearney *et al.*, 2009).

To date, there are 40 known cases of obligate parthenogenetic species in reptiles (Kearney *et al.*, 2009),

distributed in 8 families from 67 families of squamate reptiles (Uetz, 2014). The origin of lizard parthenogenesis has been studied in detail in some specific cases (e.g., *Heteronotia binoei* Gray, 1845: Moritz, 1983; 1993; *Aspidoscelis* Reeder *et al.*, 2002) and, as far as we know, in all but two cases (*Lepidophyma flavimaculatum* Duméril and Duméril, 1851: Sinclair *et al.*, 2010 and *Gymnophthalmus underwoodi* Grant, 1958: Martins, 1991; Yonenaga-Yassuda *et al.*, 1995; Benozatti and Rodrigues, 2003), parthenogenesis has a hybrid origin, where two closely related bisexual species reproduce and gave birth to fertile offspring (Kearney *et al.*, 2009; Fujita and Moritz, 2009). Two instances of parthenogenesis can be found in the endemic Neotropical family Gymnophthalmidae: *G. underwoodi* and *Leposoma percarinatum* Müller, 1923. The latter

was first proposed to be a unisexual species by Uzzell and Barry (1971), who noted that all available specimens attributed to the species at that time were females. They also suggested that *L. percarinatum* appeared as a result of a hybridization event between *L. guianense* Ruibal, 1952 and *L. parietale* Cope, 1885, based mainly on morphological evidence. Since then, only females have been recorded in the literature and in herpetological collections (Avila-Pires, 1995).

More recently, Pellegrino *et al.* (2003) analyzed the karyotypes of three females from the same locality in Brazil (Vila Rica) and found that the individuals have a triploid karyotype  $3n = 66$  (30M+36m). The karyotype of two other species of the *parietale* group known at that time, *Leposoma osvaldoi* Avila-Pires, 1995 and *L. guianense*, both with  $2n = 44$  (20M+24m; Pellegrino *et al.*, 1999) pointed to the possibility that the origin of the triploid karyotype involved a hybridization event between a bisexual species with a *L. guianense/L. osvaldoi*-like karyotype and a yet to be discovered (Pellegrino *et al.*, 2003) cryptic diploid unisexual clone of *L. percarinatum* ( $2n = 44$ , 20M+24m). Subsequently, *L. ferreirai* Rodrigues and Avila-Pires, 2005 was described based on specimens from Arquipelago de Anavilhanas, a fluvial archipelago of lower Rio Negro, state of Amazonas, Brazil (Rodrigues and Avila-Pires, 2005). The discovery of the hypothesized unisexual diploid form of *L. percarinatum* in the same geographic region of *L. ferreirai* by Laguna *et al.* (2010) led the authors to propose that the unisexual diploid clone might be the result of a hybridization event between *L. ferreirai* and *L. osvaldoi* in the lower Rio Negro region.

The last relevant piece of this puzzle was provided by Pellegrino *et al.* (2011). Based on Bayesian and maximum likelihood phylogenetic analyses (using three mitochondrial and one nuclear gene regions), the authors found that *Leposoma percarinatum* is a complex of species composed of two divergent lineages that correspond to the previously characterized diploid and triploid clones (Pellegrino *et al.*, 2011). Despite these recent major advances, important questions regarding the origin of parthenogenesis in *L. percarinatum* remains: is the origin of the unisexual diploid clone non-hybrid or did it occur by hybridization between two bisexual species? If non-hybrid, what are the historical causes that led to it? If by hybridization, which bisexual species were involved?

During the identification process of lizard specimens collected by us in Santa Isabel do Rio Negro, northwestern Amazonas State, Brazil (SIRN; 00°23'S, 64°48'W), we found seven specimens of *Leposoma* that could add additional information to this puzzle. These specimens, together with one other specimen from the Tapirapécó Expedition Base Camp, upper Rio Mavaca, departamento Amazonas, Venezuela (TBC; 02°02'N, 65°07'W), are definitely males that could not be attributed to any known described species of *Leposoma*, except *L. percarinatum*.

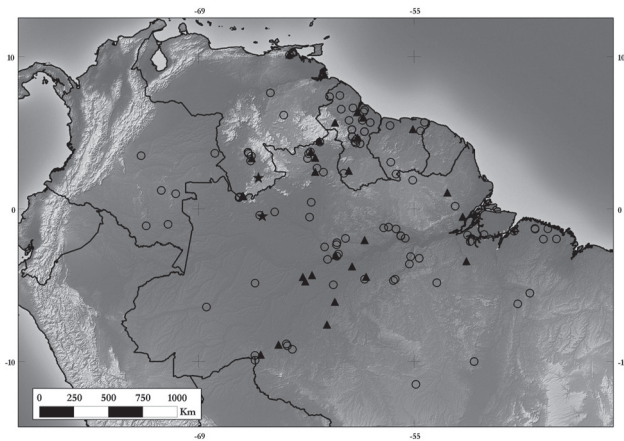
After examination of these males, our first main question was if these specimens could be classified as a new bisexual species, or if they represent a bisexual population of *L. percarinatum*. This question is not as straightforward as it may seem, because *L. percarinatum* presents intriguing morphological variation and the taxonomic status of *L. percarinatum* was challenged by the molecular results of Pellegrino *et al.* (2011). As such, to answer this question we performed the following: 1. Quantify the morphological variation found in the unisexual populations of *L. percarinatum* throughout its geographic distribution; 2. Compare it with the morphological variation found in the male specimens from SIRN and TBC, in order to detect the presence (or absence) of autapomorphies that could support the description of a potential new bisexual species of *Leposoma*.

Despite the strong evidence that the name *Leposoma percarinatum* is currently applied to more than one species or lineages of parthenogenetic clones (Avila-Pires, 1995; Pellegrino *et al.*, 2011), we chose to be conservative regarding this taxonomic issue and treat the variants as a single evolutionary unit. This procedure is justified primarily by the fact that the different lineages of *L. percarinatum sensu lato* were recovered as a monophyletic group (Pellegrino *et al.*, 2011). Also, it is very likely that complex events (e.g., multiple hybridization events) may have occurred during the evolutionary history of *L. percarinatum*, and this scenario could not be fully understood with morphological data alone. Rather, we prefer only to describe the variation observed in unisexual and bisexual populations and evaluate the degree of overlap between them in order to decide whether the male specimens should be classified as a bisexual population of *L. percarinatum* or as a potential new species. Both outcomes have important consequences for our understanding of the origins of parthenogenesis in *Leposoma*. Thus, we discuss our results not only from a taxonomic perspective, but also from a historical one (although limited), that is, what our findings tell us about the origin of parthenogenesis in *Leposoma*.

## MATERIALS AND METHODS

### Morphological variation in *Leposoma percarinatum*

We analyzed 192 adult specimens of *Leposoma percarinatum* from 34 localities in northern South America (Appendix, Fig. 1) including 31 specimens from SIRN (7 males and 24 females) plus 4 specimens from TBC (1 male and 3 females). The specimens are deposited in the herpetological collections of the American Museum of Natural History (AMNH, USA) and Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA, Brazil) or housed in the Laboratório de Herpetologia da Universidade de São Paulo,



**Figure 1.** Distribution of *Lepsosoma percarinatum* in the South America. Open circles: records of *Lepsosoma percarinatum* in the literature; Black triangles: unisexual populations studied (only females); Black stars: bisexual populations studied.

Brazil (MTR, MRT, BM, SMS and GRColli field numbers) and Laboratório de Evolução e Genética Animal, Universidade Federal do Amazonas (CTGA-L field number). We collected and analyzed 15 meristic and 10 discrete characters, all of which are relevant to species identification in *Lepsosoma* (Uzzell and Barry, 1971; Avila-Pires, 1995). We also describe the hemipenes of two specimens from SIRN (INPA-H 31130 and 31162). The morphological characters are as follows:

Discrete characters: Presence or absence of small granules between supraoculars and supraciliaries; temporal scales (keeled or not); commissure of mouth at the posterior supralabial or the scale posterior to it; posterior supralabial distinctly keeled, slightly keeled or smooth; scale immediately posterior to supralabials as large as adjacent temporals or distinctly larger; fourth chinshield enlarged or small, almost not recognizable; gular scales distinctly keeled, slightly keeled or smooth; dorsal scales at mid-body mucronate or rhomboid; condition of ventral scales (keeled or not, lanceolate or rhomboid).

Meristic characters: Scales around body (SAB); dorsals in a longitudinal row (DL, counted from occiput until the level of posterior insertion of legs); ventrals in a longitudinal row (VL, counted from the brachial region until the pre-cloacal plate); transverse rows of gulars in the neck (G, counted from the collar until the brachial region); total number of pores on pre-cloacal plate (PCL); total number of femoral pores (PF); subdigital lamellae under fourth finger (4F); subdigital lamellae under fourth toe (4T); suboculars (SOC); postoculars (POC); supraciliaries (SUP), postsupraoculars (PSOC); supralabials (SLB); infralabials (ILB); gular scales in the hyoid region (GHR, all scales situated in the ventral part of the head anteriorly to the collar, except chin shields). Variation on scale counts was analyzed both visually and with a principal components analysis (PCA), using a centered and scaled matrix. The method used to center the matrix was the

subtraction of each value of the variable by the variable mean. Scaling was performed by dividing the values of the centered columns (variables) by their standard deviations. PCA was performed using the function 'prcomp' in the package 'stats' of R for Windows v. 3.1.0 (R Core Team, 2014). Variables that showed missing data for the majority of specimens analyzed were excluded from the PCA, as were specimens that lacked one of the scale counts, since it is not possible to handle missing data in PCA. The variables included in PCA were SAB, DL, VL, G, 4F, 4T, SOC, SLB, ILB, and GCR obtained from 153 specimens of the total 192 studied. We only considered the principal components (PC) that showed an eigenvalue greater than 1.0. The differences between unisexual and bisexual populations were checked by scatterplots of every possible combination of retained PCs.

### Hemipenial morphology

Hemipenes of two individuals of *Lepsosoma percarinatum* (INPA-H 31130, 31162) were prepared following the procedures described by Manzani and Abe (1988), as modified by Pesantes (1994) and Zaher (1999). The retractor muscle was manually separated and the everted organ filled with stained petroleum jelly. The organs were immersed in an alcoholic solution of Alizarin Red for 24 hours in order to stain any calcified structures (e.g., spines or spicules) in an adaptation proposed by Nunes *et al.* (2012) of the procedures described by Uzzell (1959) and Harvey and Embert (2008). Terminology of hemipenial structures follows previous literature (Dowling and Savage, 1960; Savage, 1997; Myers and Donnelly, 2001, 2008; Nunes *et al.*, 2012).

## RESULTS

### Morphological variation

*Lepsosoma percarinatum* shows variation mainly in the meristic characters. (Table 1). The first 4 PCs of PCA together explained 63.98% of data variation. We analyzed every possible scatterplot of the PCs retained; however, considering that there was no significant difference between the scatterplots, here we only show plots of the first 2 PCs (Fig. 4, Table 3). Males and females from SIRN and TBC localities could not be distinguished from specimens from unisexual populations based on meristic characters (Fig. 4).

Similarly, discrete characters mostly failed in differentiating these specimens. Six out of ten discrete characters analyzed were invariable in all populations (Table 2). All the specimens showed keeled and lanceolate ventral scales, keeled temporal scales, commissure of the mouth



**Table 1.** Meristic variation in different populations of *Leposoma percarinatum*. *n*: Number of specimens; SAB: Scales around body; DL: Dorsals in a longitudinal row; VL: Ventrals on a longitudinal row; G: Transverse rows of gulars; 4F: Subdigital lamellae under fourth finger; 4T: Subdigital lamellae under fourth toe; SOC: Suboculars; SLB: Supralabials; ILB: Infralabials; GHR: Gular scales in the hyoid region; POC: Postoculars; SUP: Supraciliars; PSOC: Postsupraoculars; PCL: Pores on preloacal plate; PF: Femoral pores; -: Missing data.

Locality	<i>n</i>	SAB	DL	VL	G	4F	4T	SOC	SLB	ILB	GHR	POC	SUP	PSOC	PCL	PF
Caripito	5	26-24	37-35	25-23	9	14-13	19-18	6	6-5	6-5	26-25	-	-	-	4-0	0
Neblina Base Camp	2	26-24	41-37	27-25	10-9	14-13	18	7-6	7-6	6	30-29	-	-	-	4-0	0
Tapirapeco Base Camp (females)	3	27-24	39-36	25-24	11-10	13-12	19-18	7-6	6	6-5	30-26	-	-	-	4	0
Tapirapeco Base Camp (male)	1	25	36	24	11	12	17	7	6	6	28	-	-	-	4	11
Mt. Duida	2	25	38-37	26-24	10	13-12	18	7-6	6	6-5	31-28	-	-	-	4	0
Brokopondo	1	27	36	24	10	14	19	7	6	6	32	-	-	-	0	0
Isheartun	6	28-25	40-36	26-24	10-9	14-12	18-16	8-6	6	6	35-22	-	-	-	4-0	0
Wismar	1	-	36	25	10	14	19	8	6	6	30	-	-	-	4	0
Iwokrama	5	26-24	38-36	25-24	11-9	15-11	20-16	7-6	6	6-5	32-25	-	-	-	0	0
Kartabo	8	28-25	38-36	25-23	11-9	15-13	21-17	8-6	7-6	6	33-26	-	-	-	4-0	0
Kamakusa	1	26	37	23	9	11	16	6	6	6	28	-	-	-	4	0
Guyana	13	27-25	37-36	25-24	11-9	15-12	21-16	7-6	6	6-5	35-24	-	-	-	4	0
ESEC Maracá	12	28-25	39-36	27-26	11-9	13-11	19-17	7-6	6	6	14-9	4-3	6	1	2-0	0
Serra do Tepequém	1	24	38	26	11	12	18	6	6	6	14	-	-	-	2	0
Vila de Pacaraima	2	26	37-35	27-25	11-10	12-11	18-17	6	6	6	16-11	-	-	-	2	0
Serra do Apiaú	3	28-26	39-37	27-26	11-10	13-12	19	7-6	6	6	24-16	-	-	-	0	0
Serra da Maroquinha	3	26-25	38-37	26-25	10	13-12	19-18	6	6	6	15-12	-	-	-	2	0
PARNA Viruá	7	28-24	40-37	27-26	10	12	19-18	7-6	6	6	19-13	5-3	7-6	2-1	2-0	0
UHE Jirau	1	27	37	24	11	12	21	8	6	6	17	-	-	-	2	0
Porto Velho	2	26-25	37-36	23-22	10	13	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UHE Belo Monte	2	25	36	24-23	10	13-12	20-19	7-6	6	6	17-13	-	-	-	2	0
Rio Jatapu	2	27-25	37-36	23	10	13-12	19	7	6	6	28-25	-	-	-	4	0
Santa Izabel do Rio Negro (males)	7	27-24	37-36	24-23	11-9	13-11	19-18	8-7	7-6	7-6	31-18	5-4	6	2-1	4	10-9
Santa Izabel do Rio Negro (females)	24	26-24	39-36	25-22	11-10	13-12	20-17	9-6	7-6	7-6	26-16	5-3	7-6	2-1	2-0	0
São Sebastião dos Bargas	2	28-27	38-36	23	10-9	13-12	20-19	7-6	6	6	15-14	-	-	-	2	0
Lago Chaviana	3	26	37-36	24	10	12	20-19	6	6	6	15	-	-	-	2	0
Moiobamba	2	26	37-36	23	11-10	12	20-19	7	6	6	14-13	-	-	-	2	0
PARNA Pico da Neblina	23	27-24	44-36	27-24	12-10	13-12	20-17	8-6	7-6	7-6	26-14	6-3	7-6	2-0	2	0
REMAN, Manaus	11	25	38-35	23	11-10	13-12	20-18	7-6	6	6	18-14	5-4	6	1-0	2	0
Pacamiri	2	27-26	37	23	10	14-13	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Boca do Juma	1	27	36	23	10	13	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lago Ayapuá	28	27-25	38-35	24-22	11-9	13-11	20-17	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Projó	1	26	36	23	10	13	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vila Nova	1	25	37	24	10	13	20	6	6	6	31	-	-	-	0	0
Fazenda Itapuá	1	25	35	24	10	12	20	7	6	6	15	4	6	1	2	0
Laranjal do Jari	1	25	35	24	10	13	19	7	6	6	16	4	6	0	2	0
(no locality specified)	2	25	41-37	26-25	10	12	20	8-7	7	7-6	22-20	4-3	7	2	2-0	0
<b>Total</b>	<b>192</b>	<b>28-24</b>	<b>44-35</b>	<b>27-22</b>	<b>12-9</b>	<b>15-11</b>	<b>21-16</b>	<b>9-6</b>	<b>7-5</b>	<b>7-5</b>	<b>35-9</b>	<b>6-3</b>	<b>7-6</b>	<b>2-0</b>	<b>4-0</b>	<b>11-0</b>

reaching as far as last supralabial, scale immediately posterior to posterior supralabial as large as adjacent temporals, dorsal scales in the midbody mucronated and 4<sup>th</sup> chinshield small, almost not recognizable. The other three characters show considerable polymorphism, even within populations. Two of these, the presence of keels on gular scales of the hyoid region and in the last supralabial, show an interesting pattern of variation (Table 2). In all unisexual populations, the gular scales of the hyoid region and the last supralabial vary between not keeled to slightly keeled. However, in females from SIRN these characters vary from not keeled to distinctly keeled, while

in all males from SIRN these scales are distinctly keeled (Fig. 2). Unfortunately, these characters were not collected in the females or the only male from TBC.

Sexual dimorphism in *Leposoma percarinatum* agrees with the characteristics observed in other species of *Leposoma*. Males have red coloration in the ventral region, extending from head to tail. The number of femoral pores is also strongly dimorphic. All females analyzed lack femoral pores, whereas males from SIRN have 4–5 femoral pores on each leg (total number of femoral pores 9–10). The only male from TBC has 11 femoral pores in total (5 on the right leg and 6 on the left).

**Table 2.** Discrete characters observed in different populations of *Leposoma percarinatum*. Polymorphic populations are showed with state of character on the left and frequency (number of specimens) of that state in parenthesis. *n*: Number of specimens; a: Ventrals keeled (1) or smooth (0); b: Ventrals lanceolated (1) or rhomboid (0); c: Temporal scales keeled (1) or smooth (0); d: Commissure of mouth at the posterior supralabial or the scale posterior to it (1) or in the posterior scale (0); e: Scale immediately posterior to supralabials as large as adjacent temporals (1) or distinctly larger (0); f: Dorsal scales in the midbody mucronate (1) or rhomboid (0); g: 4<sup>th</sup> chin-shield enlarged (1) or small, almost not recognizable (0); h: Posterior supralabial distinctly keeled (2), slightly keeled (1) or smooth (0); i: Gular scales in the hyoid region distinctly keeled (2), slightly keeled (1) or smooth (0); j: Presence (1) or absence (0) of small granules between supraoculars and supracliaris; -: Missing data.

Locality	Country	Department	n	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j
Caripito	Venezuela	Monagas	5	1	1	1	1	1	1	0	-	-	1(3)/0(2)
Neblina Base Camp	Venezuela	Amazonas	2	1	1	1	1	1	1	0	-	-	1(1)/0(1)
Tapirapeco Base Camp (females)	Venezuela	Amazonas	3	1	1	1	1	1	1	0	-	-	0
Tapirapeco Base Camp (male)	Venezuela	Amazonas	1	1	1	1	1	1	1	0	-	-	0
Mt. Duida	Venezuela	Amazonas	2	1	1	1	1	1	1	0	-	-	0
Brokopondo	Surinam	Brokopondo	1	1	1	1	1	1	1	0	-	-	0
Isheartun	Guyana	Upper Takutu - Upper Essequibo	6	1	1	1	1	1	1	0	-	-	1(3)/0(3)
Wismar	Guyana	Upper Demerara - Berbice	1	1	1	1	1	1	1	0	-	-	0
Iwokrama	Guyana	Potaro-Siparuni	5	1	1	1	1	1	1	0	-	-	1(4)/0(1)
Kartabo	Guyana	Mazaruni-Potaro	8	1	1	1	1	1	1	0	-	-	1(2)/0(5)
Kamakusa	Guyana	Cuyuni-Mazaruni	1	1	1	1	1	1	1	0	-	-	1
Guyana	Guyana	-	13	1	1	1	1	1	1	0	-	-	1(4)/0(9)
ESEC Maracá	Brazil	Roraima	12	1	1	1	1	1	1	0	1(11)/0(1)	0	1(10)/0(2)
Serra do Tepequém	Brazil	Roraima	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0
Vila de Pacaraima	Brazil	Roraima	2	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0
Serra do Apiaú	Brazil	Roraima	3	1	1	1	1	1	1	0	1	1(1)/0(2)	1
Serra da Maroquinha	Brazil	Roraima	3	1	1	1	1	1	1	0	1	1(1)/0(2)	1(2)/0(1)
PARNA Viruá	Brazil	Roraima	7	1	1	1	1	1	1	0	1	1(1)/0(6)	1(6)/0(1)
UHE Jirau	Brazil	Rondônia	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0
Porto Velho	Brazil	Rondônia	2	1	1	1	1	1	1	0	-	-	-
UHE Belo Monte	Brazil	Pará	2	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0
Rio Jatapu	Brazil	Amazonas	2	1	1	1	1	1	1	0	-	-	0
Santa Izabel do Rio Negro (males)	Brazil	Amazonas	7	1	1	1	1	1	1	0	2	2(6)/1(1)	0
Santa Izabel do Rio Negro (females)	Brazil	Amazonas	24	1	1	1	1	1	1	0	2(13)/1(10)/0(1)	2(10)/1(6)/0(8)	1(14)/0(10)
São Sebastião dos Bargas	Brazil	Amazonas	2	1	1	1	1	1	1	0	1	1(1)/0(1)	0
Lago Chaviana	Brazil	Amazonas	3	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0
Moiobamba	Brazil	Amazonas	2	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0
PARNA Pico da Neblina	Brazil	Amazonas	23	1	1	1	1	1	1	0	1(22)/0(1)	1(11)/0(12)	1(11)/0(12)
REMAN, Manaus	Brazil	Amazonas	11	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1(5)/0(6)
Pacamiri	Brazil	Amazonas	2	1	1	1	1	1	1	0	-	-	-
Boca do Juma	Brazil	Amazonas	1	1	1	1	1	1	1	0	-	-	-
Lago Ayapuá	Brazil	Amazonas	28	1	1	1	1	1	1	0	-	-	-
Projó	Brazil	Amazonas	1	1	1	1	1	1	1	0	-	-	-
Vila Nova	Brazil	Amapá	1	1	1	1	1	1	1	0	-	-	0
Fazenda Itapuá	Brazil	Amapá	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
Laranjal do Jari	Brazil	Amapá	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0
(no locality specified)	-	-	2	1	1	1	1	1	1	0	1(1)/0(1)	0	0

### Hemipenial morphology

The hemipenes of INPA-H 31130 and 31162 (Fig. 3) are approximately 3 mm in length. The hemipenial body is roughly globose, terminating in two symmetric, small lobes ornamented by folds at the lobular apices (partially everted in both specimens); a shallow *sulcus spermaticus*, central in position, originates at the base of the organ and proceeds in a straight line towards the lobular crotch,

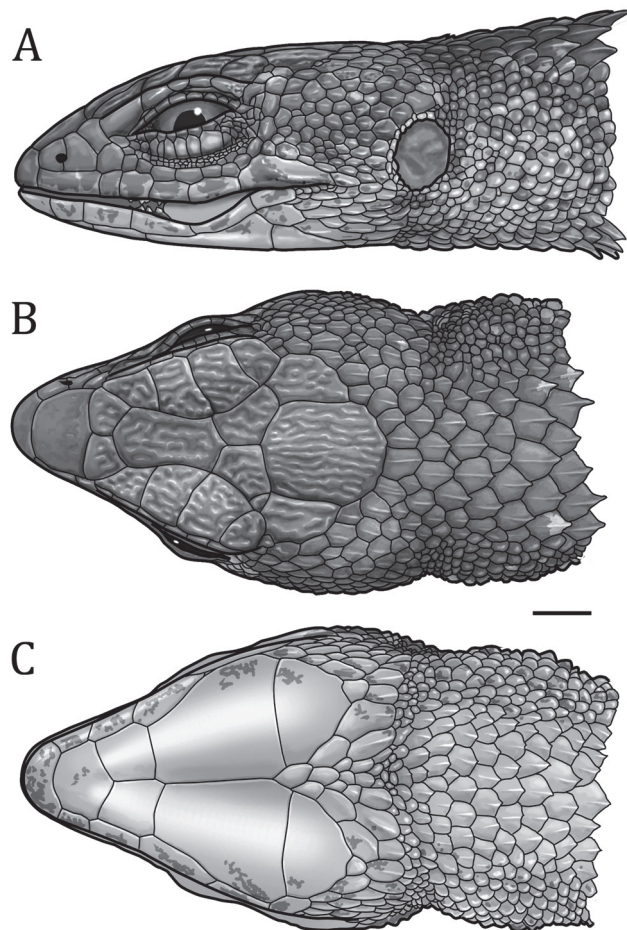
where it is divided by a small fleshy fold into two branches that run through the internal faces of the lobes to the lobular tip.

The *sulcus spermaticus* is emarginated by two parallel nude areas, each one bordered by 7–8 flounces diagonally oriented towards the sides of the organ. In each of these flounces there is a hook-shaped and calcified spine curved towards the basis of the organ. At the asulcate face of the organs there are two sets of 6–7 flounces, which increase

**Table 3.** Loadings of variables analyzed in PCA for each axis, percentage of variance explained and eigenvalues.

Variables	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10
4F	0.39	-0.07	-0.51	-0.11	-0.14	-0.17	-0.13	-0.27	-0.64	-0.15
GCR	0.30	0.02	-0.54	-0.41	0.08	-0.09	0.08	0.05	0.56	0.35
4T	-0.13	-0.23	-0.34	0.67	-0.01	0.01	-0.41	-0.31	0.31	0.03
SAB	-0.14	0.32	-0.37	0.31	-0.53	0.09	0.25	0.53	-0.08	0.04
SOC	-0.25	-0.41	-0.23	-0.14	0.21	0.73	0.03	0.12	-0.25	0.23
ILB	-0.30	-0.38	0.09	-0.17	-0.59	-0.16	0.33	-0.42	0.03	0.26
VL	-0.33	0.52	0.03	-0.20	-0.07	0.00	-0.52	-0.15	-0.17	0.51
SLB	-0.37	-0.36	-0.11	-0.33	-0.11	-0.33	-0.45	0.43	0.06	-0.32
G	-0.40	-0.01	-0.22	0.16	0.53	-0.50	0.37	0.04	-0.22	0.22
DL	-0.41	0.36	-0.28	-0.22	0.06	0.21	0.17	-0.38	0.16	-0.57
<b>Cumulative % of variance</b>	<b>20.7%</b>	<b>37.5%</b>	<b>52.9%</b>	<b>63.9%</b>	<b>72.9%</b>	<b>80.5%</b>	<b>86.5%</b>	<b>92.4%</b>	<b>96.6%</b>	<b>100%</b>
<b>Eigenvalues</b>	<b>1.44</b>	<b>1.30</b>	<b>1.24</b>	<b>1.05</b>	<b>0.95</b>	<b>0.87</b>	<b>0.78</b>	<b>0.77</b>	<b>0.64</b>	<b>0.59</b>

progressively in length from the proximal to the distal regions of the organ. Each flounce is also ornamented with hook-shaped and calcified spines that increase in size towards the distal region of the organ. Together, the two sets of flounces form a U-shaped structure that occupies



**Figure 2.** Lateral (A), dorsal (B) and ventral (C) views of the head of a male individual of *Leposoma percarinatum* (INPA-H 31166) from Santa Isabel do Rio Negro, Amazonas, Brazil. Scale bar = 5.0 mm.

most of the asulcate face. The sides of the organs have a nude longitudinal stripe separating the sets of flounces located on both faces.

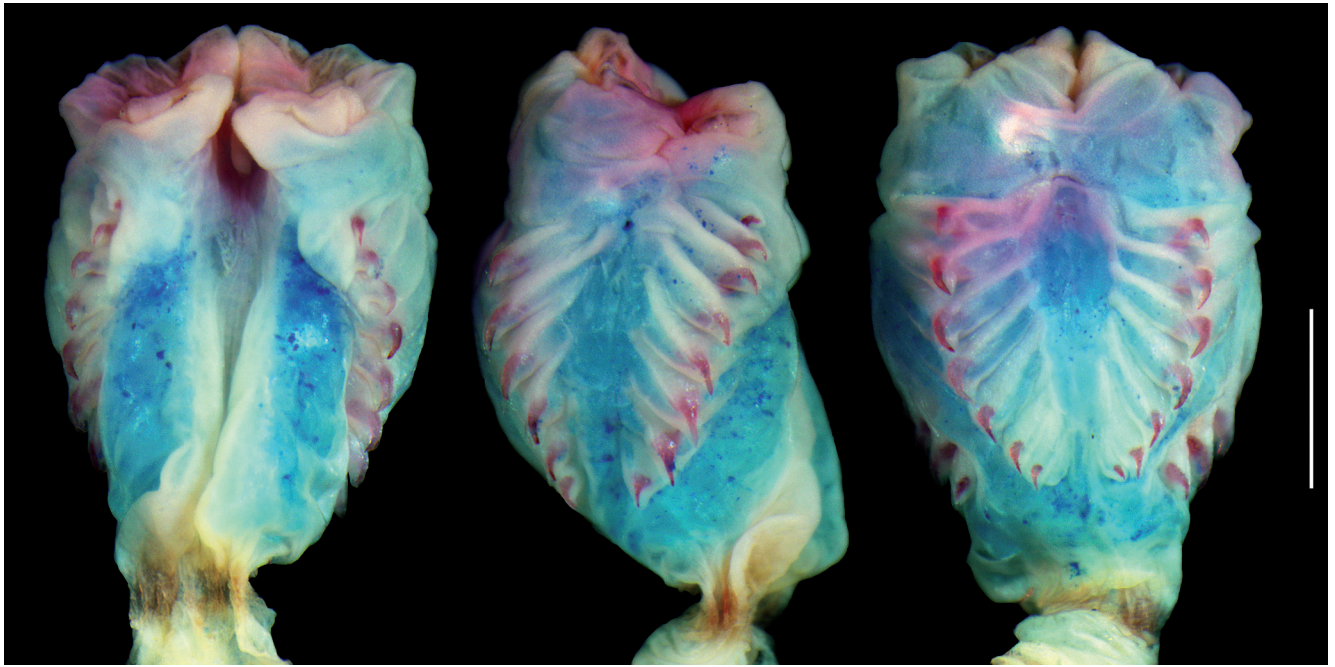
The hemipenes of the *Leposoma percarinatum* specimens described herein are very similar to those described for a population of *L. guianense* from Pico da Neblina and for *L. rugiceps* Cope, 1868 (Nunes, 2011). On the other hand, they differ markedly from those described and illustrated for specimens of *L. osvaldoi*, particularly in lacking spines or any other calcified structures in the hemipenis of this latter species (Nunes, 2011).

## DISCUSSION

### Morphological variation and taxonomy

Morphological variation in unisexual populations of *Leposoma percarinatum* may seem counterintuitive at first glance, given the clonal nature of this unisexual species. However, significant morphological variation is common in other parthenogenetic lizard species (e.g., *Aspidocelis tessellata* Say, 1823; Taylor *et al.*, 2003) and may be explained by several hypotheses, involving genetic causes, including (1) multiple hybridization events resulting in independent lineages, (2) postformational mutations occurring in a lineage derived from a single F1 hybridization event (Zweifel, 1965; Taylor *et al.*, 2003), (3) epigenetic events, such as the interaction between the genotype and environment during development, generating phenotypic variation even in the absence of genotypic variation, (4) DNA methylation, or (5) the mechanism of sister chromosome pairing (Kearney *et al.*, 2009; Lutes *et al.*, 2010).

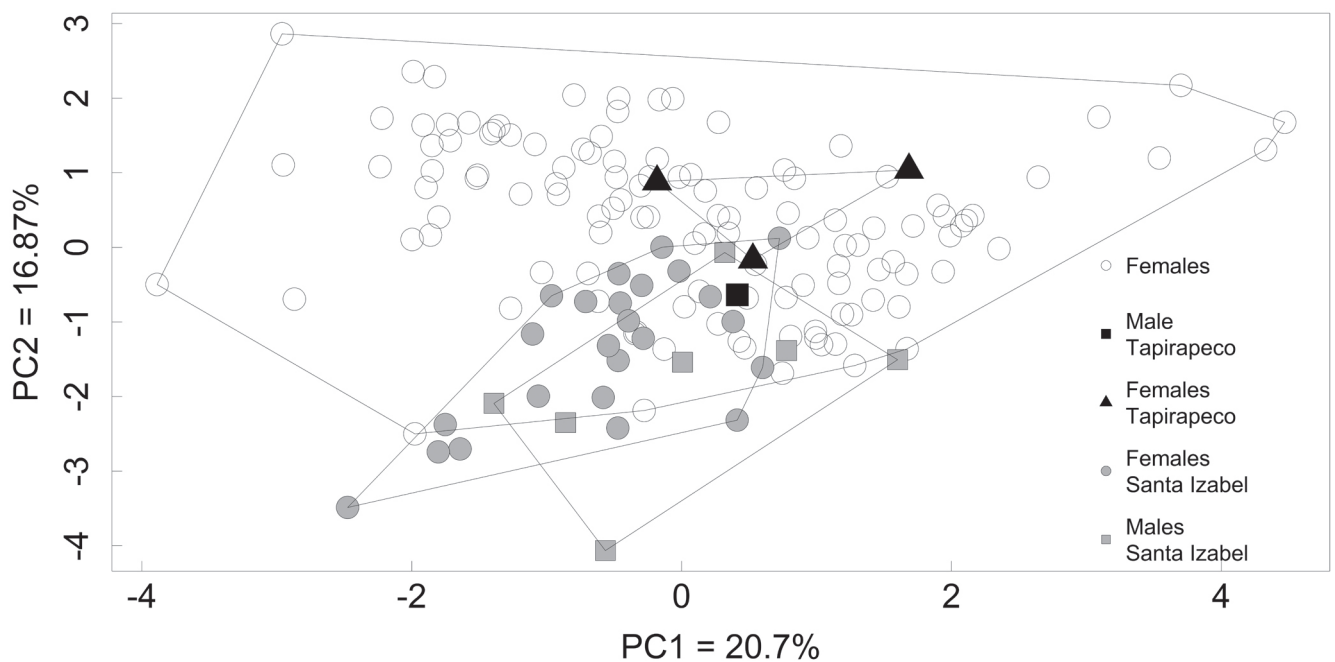
Molecular evidence from three mitochondrial and one nuclear genes, as well as karyotypic data, suggest that morphological variation in *L. percarinatum* resulted from at least two independent hybrid origins that occurred approximately 4 million years ago (Pellegriño *et al.*, 2011). However, the independent origins hypothesis does not



**Figure 3.** From left to right, sulcate, lateral and asulcate faces of *Lepsosoma percarinatum* left hemipenis (INPA-H 31162).

explain the presence of intrapopulational morphological variation detected in *L. percarinatum*, indicating that one or more of the mechanisms cited above could also increase the phenotypic variation in *Lepsosoma*. Whether the different lineages should be classified as different species, as well as the level of congruence between morphological and molecular variation, must be assessed by more detailed future studies.

This is not the first time that specimens of *Lepsosoma* from SIRN were studied. Two individuals of *Lepsosoma percarinatum* (MPEG 1937–1938) from Tapurucuara (the old name of Santa Izabel do Rio Negro) were analyzed by Avila-Pires (1995) and referred to as *Lepsosoma* cf. *percarinatum* because MPEG 1937 was a male. Avila-Pires (1995) raises the possibility that these specimens might belong to a cryptic species involved in the origin of



**Figure 4.** Scatterplot of first and second principal axis (PC) of a Principal Component Analysis (PCA) performed with 153 specimens of *Lepsosoma percarinatum* from 28 localities.

parthenogenesis in *L. percarinatum*, due to shared characters between them and their absence in *L. guianense* or *L. parietale*, the two species hypothesized to be the parental species of *L. percarinatum* at that time (Uzzell and Barry, 1971). We do not discard this hypothesis given the overall conservative morphology of *Leposoma*, but our analyses show that bisexual and unisexual populations are morphologically indistinguishable (Fig. 4). Based on our data, we cannot discard the possibility that the distinct keeled gular scales in the hyoid region and the keeled posterior supralabial (character observed in some females and males from SIRN) are autapomorphies of this putative new taxon. However, the presence of females from SIRN with smooth or slightly keeled gulars and posterior supralabial scales prevents us from concluding that they are autapomorphic. Although there is the possibility that non-parthenogenetic and parthenogenetic females showing small morphological differences could occur sympatrically at SIRN, we believe that only a detailed molecular analysis could provide sufficient evidence to better understand the taxonomic status of these bisexual populations. For instance, if it is confirmed that the non-parthenogenetic and parthenogenetic lineages occur in sympatry at SIRN, detailed studies must be made to determine if, and in what degree, gene flow exist between lineages. This question has important implications on the taxonomic status of lineages.

In a review of the complicated taxonomy of *Cnemidophorus*, Wright (1993) proposed six recommendations about nomenclatural issues in dealing with parthenogenetic taxa (Wright, 1993: 50–51). Our decision to keep the bisexual population described here within *Leposoma percarinatum* is partially in agreement with those recommendations, mainly because the author is not clear about which procedures to follow when there are no diagnostic characters (whatever the data source) for bisexual and unisexual populations of a parthenogenetic taxa. Wright's (1993: 50) first recommendation, "Diagnosable (by any means) reproducing uniparental populations should be named unless there is a genealogical (phylogenetic) reason for not doing so..." suggest that diagnosis must be considered during a taxonomical approach regarding parthenogenetic taxa. The other two suggestions that are relevant to our results are the second, "Every origin of a uniparental historical group by hybridization (or other means) from biparental ancestors constitutes the origin of a new entity and therefore a species" (p. 50), and the sixth, "Obligately uniparental historical groups irreversibly removed phylogenetically from their bisexual ancestors must be recognized as species regardless of the mode of origin" (p. 51). We partially disagree with suggestion 2, in that we believe that Wright (1993) did not properly consider unisexual lineages with non-hybrid origin in his study (mainly because there is no known species of *Cnemidophorus* whose origin is not by hybridization; Moritz, 1992; Wright, 1993). Regarding suggestion

6, we still do not have phylogenetic results including uni- and bisexual *L. percarinatum*, limiting our knowledge on this subject. Given the points raised above, we choose to maintain a conservative approach, provisionally treating uni and bisexual populations as the same species.

## Origins

The discovery of at least two bisexual populations in the upper Rio Negro adds new data to the possible scenarios that lead to the origin of parthenogenesis in *Leposoma*. First, regardless the origin of parthenogenesis in *L. percarinatum* (hybrid or non-hybrid), its appearance probably occurred on northern Amazonia near the area where the bisexual populations were found. Interestingly, this area hosts a surprisingly high concentration of parthenogenetic species (albeit some of them with limited and non-coincident distributions), such as the gymnophthalmid *Gymnophthalmus underwoodi* (two clones, Yonenaga-Yassuda *et al.*, 1995; Benozatti and Rodrigues, 2003), the teiids *Kentropyx borckiana* Peters, 1869, and several species of the *Cnemidophorus lemniscatus* Linnaeus, 1758 species complex, which includes unisexual and bisexual populations (Avila-Pires, 1995; Cole *et al.*, 1995). This pattern differs strikingly from what is observed in other regions of South America where lizard parthenogenesis is rare and affects a single species. *Ameivula nativo* (Rocha *et al.*, 1997), occurring along the coast in the Atlantic Forest and *Teius suquiensis* Avila and Martori 1991 in southwestern South America, are the only other two examples. More intriguing, northern Amazonia is remarkable due to its environmental heterogeneity, showing several types of savanna-like environments such as Campinas, Campinaranas, Lavrado, and patches of open habitat, in addition to the characteristically humid Amazonian Rainforest. This environmental heterogeneity could reflect historical climatic instability, which in turn could be the ideal scenario to promote parthenogenesis. An area with fluctuating and unstable habitats could result in an increase in both the faunal interchange between habitats and the probability of hybridization events.

However, hybridization may not be the process that led to the appearance of clones in *Leposoma percarinatum*. The diploid clone of *L. percarinatum* was hypothesized to have appeared by a hybridization event between *L. ferreirai* and *L. osvaldoi* in the lower Rio Negro (Rodrigues and Avila-Pires, 2005; Laguna *et al.*, 2010). The discovery of males that are morphologically identical to parthenogenetic *L. percarinatum* could be viewed as an argument against the hybrid origin. Parthenogenesis in lizards is very often the result of hybridization events between bisexual species from different species groups, as is the case in most unisexual species of *Aspidoscelis* (Moritz *et al.*, 1992; Reeder *et al.*, 2002). Asexual lineages that resulted

from hybridization often (but not necessarily) also have a hybrid morphology, with mixed characters from the two parental species (e.g., Taylor *et al.*, 2012). Apparently this is not the case in *L. percarinatum*, since bisexual, diploid and triploid populations are indistinguishable morphologically, with no apparent phenotypic contribution from either *L. ferreirai* or *L. osvaldoi*.

However, morphological data only do not provide enough evidence to firmly decide between hybrid and non-hybrid origins, as evidenced in the other parthenogenetic gymnophthalmid species, *Gymnophthalmus underwoodi*. Its origin is better studied (Vanzolini, 1976; Cole *et al.*, 1990, 1993; Martins, 1991; Yonenaga-Yassuda *et al.*, 1995; Kizirian and Cole, 1999, Benozzati and Rodrigues, 2003) and it proved to be a species complex, with two parthenogenetic clones identified, each independently arisen. The lineage from Suriname, Venezuela and Trinidad undoubtedly originated as a result of a hybridization event between *G. cryptus* and *G. speciosus*, as confirmed by the high levels of heterozygosity in the specimens analyzed and karyological evidence (Cole *et al.*, 1990, 1993; Kizirian and Cole, 1999). However, a non-hybrid origin was proposed for samples from Suriname and the Brazilian state of Roraima, mainly based on studies using allozymes (Martins, 1991), chromosomes (Yonenaga-Yassuda *et al.*, 1995) and mtDNA restriction site variation (Benozzati and Rodrigues, 2003). For example, cytogenetic analyses of samples from Roraima suggest the existence of clones without chromosomal heteromorphisms, pointing to a non-hybrid parthenogenetic appearance event. This case could be illustrative of *L. percarinatum*; however, too few molecular and karyotypic data are available for *L. percarinatum* given the extent of its geographical distribution (Pellegrino *et al.*, 1999, 2003, 2011; Laguna *et al.*, 2010). The great variability found in the few cytogenetic, molecular and morphological results available for *L. percarinatum* indicate that we are still far away from a satisfactory explanation about the origin, maintenance and evolution of parthenogenesis in *Leposoma*.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, PhD. fellowship to S.M.S., Proc 2012/10163-1, post-doctoral fellowship to P.M.S.N, Proc 2012/00492-8, grants 2011/50146-6 to M.T.R.), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM and CNPq/SISBIOTA - BioPHAM project 563348/2010), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, research fellowship to A.P.A., L.F., M.T.R, I.P.F. and T.H.), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, PhD. fellowship to D.P.O.). The authors are grateful to ICMBio for collecting permits, to David Kizirian and Darrel

Frost (AMNH), Richard Vogt (INPA) that allowed the examination of specimens under their care. Sebastião Batista, Ocirio Pereira and the residents of the communities of Santa Isabel do Rio Negro gave invaluable help in opening trails and assistance on field work. Alessandra Marques de Souza kindly reviewed the English grammar.

#### REFERENCES

- Avila L.J., Martori R.A. 1991.** A unisexual species of *Teius* Merrem 1820 (Sauria Teiidae) from central Argentina. *Tropical Zoology* 4:193–201.
- Avila-Pires T.C.S. 1995.** Lizards of Brazilian Amazonia (Reptilia: Squamata). *Zoologische Verhandlungen* 299:1–706.
- Benozzati M.L., Rodrigues M.T. 2003.** Mitochondrial restriction-site characterization of a Brazilian group of eyelid-less gymnophthalmid lizards. *Journal of Herpetology* 37:161–168.
- Cole C.J., Dessauer H.C., Townsend C.R., Arnold M.G. 1990.** Unisexual lizards of the genus *Gymnophthalmus* (Reptilia: Teiidae) in the Neotropics: genetics, origin, and systematics. *American Museum Novitates* 2994:1–29.
- Cole C.J., Dessauer H.C., Markezich A.L. 1993.** Missing link found: the second ancestor of *Gymnophthalmus underwoodi* (Squamata: Teiidae), a South American unisexual lizard of hybrid origin. *American Museum Novitates* 3055:1–13.
- Cole J.C., Dessauer H.C., Townsend C.R., Arnold M.G. 1995.** *Kentropyx borckiana* (Squamata: Teiidae): a unisexual lizard of hybrid origin in the Guiana region, South America. *American Museum Novitates* 3145:1–23.
- Cope E.D. 1868.** Sixth contribution to the herpetology of Tropical America. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* 20:305–313.
- Cope E.D. 1885.** Catalogue of the species of batrachians and reptiles contained in a collection made at Pebas, upper Amazon, by John Hauxwell. *Proceedings of the American Philosophical Society* 23:94–103.
- Dowling H.G., Savage J.M. 1960.** A guide to the snake hemipenis: a survey of basic structure and systematic characteristics. *Zoologica* 45:17–28.
- Duméril A.M.C., Duméril A.H.A. 1851.** Catalogue méthodique de la collection des reptiles du Muséum d'Histoire Naturelle de Paris. Gide et Baudry/Roret, Paris.
- Felsenstein J. 1974.** The evolutionary advantage of recombination. *Genetics* 78:737–756.
- Fujita M.K., Moritz C. 2009.** Origin and evolution of parthenogenetic genomes in lizards: current state and future directions. *Cytogenetic and Genome Research* 127:261–272.
- Grant C. 1958.** A new *Gymnophthalmus* (Reptilia, Teiidae) from Barbados, B.W.I. *Herpetologica* 14:227–228.
- Gray J.E. 1845.** Catalogue of the specimens of lizards in the collection of the British Museum. Trustees of British Museum, London.
- Harvey M.B., Embert D. 2008.** Review of Bolivian *Dipsas* (Serpentes: Colubridae), with comments on other South American species. *Herpetological Monographs* 22:54–105. doi:10.1655/07-023.1
- Kearney M., Fujita M.K., Ridenour J. 2009.** Lost sex in the Reptiles: Constraints and Correlations. Pp. 447–474, in Schön I., Martens K., van Dijk P. (Eds.), *Lost Sex: The evolutionary biology of parthenogenesis*. Springer, New York.
- Kizirian D.A., Cole C.J. 1999.** Origin of the unisexual lizard *Gymnophthalmus underwoodi* (Gymnophthalmidae) inferred from mitochondrial DNA nucleotide sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 11:394–400.
- Laguna M.M., Rodrigues M.T., dos Santos R.M.L., Yonenaga-Yassuda Y., Avila-Pires T.C.S., Hoogmoed M.S., Pellegrino**

- K.C.M. 2010.** Karyotypes of a cryptic diploid form of the unisexual *Leposoma percarinatum* (Squamata, Gymnophthalmidae) and the bisexual *Leposoma ferreirai* from the lower Rio Negro, Amazonian Brazil. *Journal of Herpetology* 44:153–157.
- Linnaeus C. 1758.** Systema naturæ per regna tria naturæ, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. Tomus I. Editio decima, reformata. Laurentii Salvii, Stockholm.
- Lutes A.A., Neaves W.B., Baumann D.P., Wiegräbe W., Baumann P. 2010.** Sister chromosome pairing maintains heterozygosity in parthenogenetic lizards. *Nature* 464:283–286. doi:10.1038/nature08818
- MacCulloch R.D., Murphy R.W., Kupriyanova L.A., Darevsky I.S. 1997.** The Caucasian rock lizard *Lacerta rostombekovi*: a monoclonal parthenogenetic vertebrate. *Biochemical Systematics and Ecology* 25:33–37.
- Manzani P.R., Abe A.S. 1988.** Sobre dois novos métodos de preparo do hemipênis de serpentes. *Memórias do Instituto Butantan* 50:15–20.
- Martins J.M. 1991.** An electrophoretic study of two sibling species of the genus *Gymnophthalmus* and its bearing on the origin of the parthenogenetic *G. underwoodii* (Sauria, Teiidae). *Revista Brasileira de Genética* 14:691–703.
- Maynard-Smith J. 1978.** The Evolution of Sex. Cambridge University Press, Cambridge.
- Moritz C. 1983.** Parthenogenesis in the endemic Australian lizard *Heteronotia binoei* (Gekkonidae). *Science* 220:735–737.
- Moritz C. 1992.** Mitochondrial DNA analyses and the origin and relative age of parthenogenetic *Cnemidophorus*: phylogenetic constraints on hybrid origins. *Evolution* 46:184–192.
- Moritz C. 1993.** The origin and evolution of parthenogenesis in the *Heteronotia binoei* complex: synthesis. *Genetica* 90:269–280.
- Müller L. 1923.** Neue oder seltene Reptilien und Batrachier der Zoologischen Sammlung des bayrischen Staates. *Zoologischer Anzeiger* 57:145–156.
- Myers C.W., Donnelly M.A. 2001.** Herpetofauna of the Yutajé-Corocoro massif, Venezuela: second report from the Robert G. Goelet American Museum-Terramar Expedition to the northwestern Tepuis. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 261:1–85.
- Myers C.W., Donnelly M.A. 2008.** The summit herpetofauna of Auyantepui, Venezuela: report from the Robert G. Goelet American Museum-Terramar Expedition. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 308:1–147.
- Nunes P.M.S. 2011.** Morfologia hemipeniana dos lagartos microteideos e suas implicações nas relações filogenéticas da família Gymnophthalmidae (Teiioidea: Squamata) Volumes 1 and 2. Ph.D. Dissertation. Universidade de São Paulo, Brazil.
- Nunes P.M.S., Fouquet A., Curcio F.F., Kok P.J.R., Rodrigues M.T. 2012.** Cryptic species in *Iphisa elegans* Gray, 1851 (Squamata: Gymnophthalmidae) revealed by hemipenial morphology and molecular data. *Zoological Journal of the Linnean Society* 166:361–376. doi:10.1111/j.1096-3642.2012.00846.x
- Pellegrino K.C.M., Rodrigues M.T., Yononaga-Yassuda Y. 1999.** Chromosomal evolution in the Brazilian lizards of genus *Leposoma* (Squamata, Gymnophthalmidae) from Amazon and Atlantic rain forests: banding patterns and FISH of telomeric sequences. *Hereditas* 131:15–21.
- Pellegrino K.C.M., Rodrigues M.T., Yononaga-Yassuda Y. 2003.** Triploid karyotype of *Leposoma percarinatum* (Squamata, Gymnophthalmidae). *Journal of Herpetology* 37:197–199.
- Pellegrino K.C.M., Rodrigues M.T., Harris D.J., Yononaga-Yassuda Y., Sites J.W. Jr. 2011.** Molecular phylogeny, biogeography and insights into the origin of parthenogenesis in the Neotropical genus *Leposoma* (Squamata: Gymnophthalmidae): Ancient links between the Atlantic Forest and Amazonia. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 61:446–459. doi:10.1016/j.ympev.2011.07.010
- Pesantes O.S. 1994.** A method for preparing the hemipenis of preserved snakes. *Journal of Herpetology* 28:93–95.
- Peters W.C.H. 1869.** Eine Mittheilung über neue Gattungen und Arten von Eidechsen. *Monatsberichte der Königlichen Preussische Akademie des Wissenschaften zu Berlin* 1869:57–66.
- R Core Team. 2014.** R: A language and environment for statistical computing, Version 3.1.1. Available from: www.R-project.org.
- Reeder T.W., Cole C.J., Dessauer H.C. 2002.** Phylogenetic relationships of whiptail lizards of the genus *Cnemidophorus* (Squamata: Teiidae): a test of monophyly, reevaluation of karyotypic evolution, and review of hybrid origins. *American Museum Novitates* 3365:1–61.
- Rocha C.F.D., Bergallo H.G., Peccinini-Seale D. 1997.** Evidence of an unisexual population of the Brazilian whiptail lizard genus *Cnemidophorus* (Teiidae), with description of a new species. *Herpetologica* 53:374–382.
- Rodrigues M.T., Avila-Pires T.C.S. 2005.** New lizard of the genus *Leposoma* (Squamata, Gymnophthalmidae) from the Lower Rio Negro, Amazonas, Brazil. *Journal of Herpetology* 39:541–546. doi:10.1670/240-04A.1
- Ruibal R. 1952.** Revisionary studies of some South American Teiidae. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology* 106:477–529.
- Savage J.M. 1997.** On terminology for the description of the hemipenis of squamate reptiles. *Herpetological Journal* 7:23–25.
- Say T. 1823.** Account of an expedition from Pittsburgh to the Rocky Mountains, performed in the years 1819, '20, by order of the Hon. J.C. Calhoun, Secretary of War, under the command of Major Stephen H. Long. H.C. Carey & I. Lea, Philadelphia.
- Sinclair E.A., Pramuk J.B., Bezy R.L., Crandall K.A., Sites J.W. Jr. 2010.** DNA evidence for nonhybrid origins of parthenogenesis in natural populations of vertebrates. *Evolution* 64:1346–1357. doi:10.1111/j.1558-5646.2009.00893.x
- Taylor H.L., Cole C.J., Dessauer H.C., Parker E.D. Jr. 2003.** Congruent patterns of genetic and morphological variation in the parthenogenetic lizard *Aspidoscelis tessellata* (Squamata: Teiidae) and the origins of color pattern classes and genotypic clones in eastern New Mexico. *American Museum Novitates* 3424:1–40.
- Taylor H.L., Cole C.J., Manning G.J., Cordes J.E., Walker J.M. 2012.** Comparative meristic variability in whiptail lizards (Teiidae, *Aspidocelis*): samples of parthenogenetic *A. tessellata* versus samples of sexually reproducing *A. sexlineata*, *A. marmorata*, and *A. gularis septemvittata*. *American Museum Novitates* 3744:1–24.
- Uetz P. (Ed.). 2014.** The Reptile Database, all caps. Accessible at www.reptile-database.org. Accessed: 30 July 2014.
- Uzzell T.M. 1959.** Teiid lizards related to *Proctoporus luctuosus*, with the description of a new species from Venezuela. *Occasional Papers of the Museum of Zoology, University of Michigan* 597:1–15.
- Uzzell T.M., Barry J.C. 1971.** *Leposoma percarinatum*, a unisexual species related to *L. guianense*; and *Leposoma ioanna*, a new species from Pacific coastal Colombia (Sauria, Teiidae). *Postilla Peabody Museum Yale University* 154:0–39.
- Vanzolini, P.E. 1976.** On the presence of males in *Gymnophthalmus underwoodi*, a presumed all-female lizard species (Sauria, Teiidae). *Papeis Avulsos de Zoologia* 29:177–179.
- Wright J.W. 1993.** Evolution of the lizards of the genus *Cnemidophorus*. Pp. 27–81, Wright J.W., Vitt L.J. (Eds.), *Biology of Whiptail Lizards (Genus Cnemidophorus)*. Oklahoma Museum of Natural History, Norman.
- Yononaga-Yassuda Y., Vanzolini P.E., Rodrigues M.T., de Carvalho C.M. 1995.** Chromosome banding patterns in the unisexual microteiid *Gymnophthalmus underwoodi* and in two related sibling species (Gymnophthalmidae, Sauria). *Cytogenetic and Cell Genetics* 70:29–34.
- Zaher H. 1999.** Hemipenial morphology of the South American Xenodontine snakes, with a proposal for a monophyletic Xenodontinae and a reappraisal of colubroid hemipenis. *Bulletin of American Museum of Natural History* 240:1–168.
- Zweifel R.G. 1965.** Variation in and distribution of the unisexual lizard, *Cnemidophorus tessellatus*. *American Museum Novitates* 2235:1–49.

## APPENDIX

### Specimens examined

*Leposoma percarinatum* ( $n = 192$ ): Brazil: **Amapá:** Fazenda Itapuã, GRColli 2550; Laranjal do Jari: 42 km E de Laranjal do Jari (01°04'N, 52°50'W), MTR 13981; Mazagão: Vila Nova (00°30'S, 51°50'W), AMNH 138720; **Amazonas:** Novo Aripuanã: Boca do Juma, right bank of Rio Aripuanã (06°04'S, 60°09'W), INPA-H 12154; Apuí: Comunidade Projó, right bank of Rio Aripuanã (07°35'S, 60°40'W), INPA-H 17712; Nova Olinda do Norte: Comunidade São Sebastião dos Bargas, right bank of Rio Madeira (03°45'S, 59°02'W), SMS 647,703; Anori: Lago Ayapuá, left bank of Rio Purus (04°27'S, 62°13'W), INPA-H 14128, 14130–14132, 14134, 14136–14138, 14140, 14142–14145, 14147, 14148, 14150, 14152, 14153, 14155–14160, 14162–14165; Beruri: Lago Chaviana, right bank of Rio Purus (04°20'S, 61°38'W), MTR 18811, 18899, 18922; Moioabamba, right bank of Rio Purus (04°44'S, 62°04'W), MTR 19391, 19424; Maués: Pacamiri, right bank of Rio Abacaxis (04°26'S, 58°07'W), MTR 13110, 13211; Santa Isabel do Rio Negro: Parque Nacional do Pico da Neblina (00°44'N, 65°58'W), INPA-H 12765, 15088–15091, 15093, 15094, 15096, 15098–15100, 15102, 15103, 15105, 15816, 22725, 22727, 22729, 22730, 22732–22734, 22736; Santa Isabel do Rio Negro, Rio Ayuanã, right bank of Rio Negro (00°35'S, 64°54'W), INPA-H 31170, 31171; Santa Isabel do Rio Negro, Rio Daraá, left bank of Rio Negro (00°23'S, 64°48'W), INPA-H 31128, 31130–31137, 31139–31141, 31143, 31144, 31146–31152, 31154, 31156–31158, 31162, 31164–31166; Manaus: REMAN/Petrobrás (03°08'S, 59°56'W), INPA-H 17835, 17842, 17843, 17850, 17851, 17852, 18396, 18399, 18400, 18405, 18409; São Sebastião do Uatumã: São João do Lago da Velha, right bank Rio Jatapu (02°02'S, 58°13'W), CTGA-L 027,113; **Pará:** Anapú: Surroundings UHE Belo Monte (03°30'S, 51°40'W), BM 685, 688; **Rondônia:** Porto Velho: Porto Velho (08°53'S, 63°48'W), INPA-H 14917–14918; UHE Jirau (09°32'S, 64°58'W), MTR 18102; **Roraima:** Amajari: Estação Ecológica de Maracá (03°21'N, 61°26'W), INPA-H 18937, 18938, 18940, 18942, MTR 20416, 20417, 20462, 20463, 20636, 20644, 20651, 20652; Serra do Tepequém (03°45'N, 61°43'W), MTR 20961; Caracará: Parque Nacional do Viruá (01°30'N, 61°09'W), INPA-H 18945, 18947, 18950, 18951, 19068, 19275, 19406; Mucajaí: Serra da Maroquinha (02°21'N, 61°24'W), MTR 23062, 23097, 23117; Serra do Apiaú (02°26'N, 61°26'W), SMS 823, 824, 990; Pacaraima: Pacaraima (04°28'N, 61°09'W), MTR 20742; GUYANA: **Guyana** (no specific locality): AMNH 152010, 152011, 152015, 152017–152019, 152027, 152029, 152032–152036; **Cuyuni-Mazaruni:** Kartabo (06°21'N, 58°41'W), AMNH 21263, 21266, 46433–46436; Kamakusa (05°40'N, 60°08'W), AMNH 25082; **Potaro-Siparuni:** Iwokrama (04°40'N, 58°41'W), AMNH 148656–148658, 148662, 148663; **Upper Demerara-Berbice:** Wismar (Linden) (06°00'N, 58°19'W), AMNH 58981; **Upper Takutu-Upper Essequibo:** Aishalton (02°30'N, 59°15'W), AMNH 61418, 61419, 141322–141325; SURINAM: **Brokopondo:** Brokopondo (05°14'N, 55°05'W), AMNH 108776; VENEZUELA: **Amazonas:** Cerro Duida (03°20'N, 65°33'W), AMNH 36637, 39320; Neblina Base Camp (00°50'N, 66°10'W), AMNH 129879, 133655; Tapirapeco Base Camp (02°01'N, 65°07'W), AMNH 134179, 134181, 134182, 137220; **Monagas:** Caripito (10°08'N, 63°06'W), AMNH 137617, 137622, 137623, 137625, 137626.



## Apêndice 2. Primers e condições das PCR's usados neste estudo

Gene	PCR Conditions	PCR reagents *1	Primer	Sequence	F / R	Reference
RAG-1	94°(0:30)/ 51°(0:30)/72°(1:00)x35	H <sub>2</sub> O:5.95/ TP: 1.5 /MgCl <sub>2</sub> : 0.9/ DNTP: 1.5 /Pr1: 1.5 /Pr2: 1.5, DNA: 2.0/Taq:0.15	RAG1_F1a	CAG CTG YAG CCA RTA CCA TAA AAT	forward	Wiens et al. 2008
			RAG1_R2	CTT TCT AGC AAA ATT TCC ATT CAT	reverse	Wiens et al. 2008
KIAA2018	94°(0:30)/ 59°(0:45)/72°(1:00)x40	H <sub>2</sub> O:6.25/ TP: 1.0/MgCl <sub>2</sub> : 1.0/ DNTP: 1.0/Pr1: 0.5/Pr2: 0.5, DNA: 1.0/Taq:0.05	KIAA2018-F1	RCC CAT CCY TAC CTA TGC AGC CAT TA	forward	Portik et al. 2012
			KIAA2018-R1	YTG CCC AGC CAT TTG TGA TAT GCT YTG A	reverse	Portik et al. 2012
NT3	94°(0:40)/ 53°(0:40)/72°(0:50)x35	H <sub>2</sub> O:5.95/ TP: 1.5/MgCl <sub>2</sub> : 0.9/ DNTP: 1.5/Pr1:1.5/Pr2:1.5, DNA: 1.0/Taq:0.15	NT3-F1	ATG TCC ATC TTG TTT TAT GTG ATA TTT	forward	Townsend et al. 2008
			NT3_R1	ACR AGT TTR TTG TTY TCT GAA GTC	reverse	Townsend et al. 2008
CYTB	95°(0:25)/ 48°(1:00)/72°(2:00)x40	H <sub>2</sub> O:8.625/ TP: 1.5/MgCl <sub>2</sub> : 1.5/ DNTP: 0.75/Pr1: 0.75/Pr2: 0.75, DNA: 1.0/Taq:0.125	LGL 765	GGA AAA ACCA YCG TTG TWA TTC AAC T	forward	Bickham et al. 1995
			H15149	TGC AGC CCC TCA GAA TGA TAT TTG TCC TCA	reverse	Bickham et al. 1995
ND4	94°(0:40)/ 50°(0:40)/72°(1:00)x34	H <sub>2</sub> O:8.625/ TP: 1.5/MgCl <sub>2</sub> : 1.5/ DNTP: 0.75/Pr1: 0.75/Pr2: 0.75, DNA: 1.0/Taq:0.125	ND4-F	CAC CTA TGA CTA CCA AAA GCT CAT GTA GAA GC	forward	Arevalo et al. 1994
			LEU	CAT TAC TTT TAC TTG GAA TTT GCA CCA	reverse	Arevalo et al. 1994
12s	94°(0:40)/ 51°(0:40)/72°(0:50)x35	H <sub>2</sub> O:8.625/ TP: 1.5/MgCl <sub>2</sub> : 1.5/ DNTP: 0.75/Pr1: 0.75/Pr2: 0.75, DNA: 1.0/Taq:0.125	12s-a	CTG GGA TTA GAT ACC CCA CTA	forward	Harris et al. 1998
			12s-b	TGA GGA GGG TGA CGG GCG GT	reverse	Harris et al. 1998

## Apêndice 3. Variáveis morfológicas analisadas

As variáveis merísticas utilizadas foram baseadas em AVILA-PIRES (1995) e compreenderam: Poros na placa pré-cloacal (esquerda e direita); Poros femorais (esquerda e direita); Escamas ao redor do corpo; Dorsais em linha longitudinal (contadas a partir da nuca até o nível da inserção posterior das patas traseiras); Ventrals em linha longitudinal (contadas da região braquial até a placa pré-cloacal); Fileiras transversais de gulares; Lamelas do 4° dedo da pata dianteira e pata esquerda (esquerda e direita); Soma das escamas suboculares e pós-oculares (contadas desde a frenocular até a parietal, apenas no lado direito); Supraoculares (esquerda e direita); Supraciliares (esquerda e direita); Pós-supraoculares (esquerda e direita); Supralabiais (esquerda e direita); Sublabiais (esquerda e direita).

Medidas morfométricas foram baseadas em RECODER e col.2014 e compreenderam: Comprimento rostro-cloacal (medido da abertura da cloaca até o rostro); Comprimento do tronco (da margem posterior da inserção do braço até a margem anterior da inserção da perna); Largura da cabeça (maior largura da cabeça); Comprimento da cabeça (desde a borda anterior da abertura timpânica até o rostro); Comprimento do olho; Focinho (desde a margem anterior do olho até o rostro); Húmero (da inserção anterior do braço até o cotovelo); Antebraço (do cotovelo até a ponta do 4º dedo); Fêmur (da inserção anterior da perna até o joelho); Tíbia (do joelho até o calcanhar); Plantar da pata (do calcanhar até a ponta do 4º dedo). Também consideramos as seguintes proporções como medidas morfométricas: Proporção entre o comprimento do contato entre as pré-frontais e frontoparietais; Proporção entre o maior comprimento e maior largura da escama interparietal.

A descrição das variáveis categóricas podem ser visualizadas na tabela 3 do Capítulo 2.

#### **Apêndice 4.** Espécimes analisados quanto a morfologia

*Loxopholis caparensis*: **COLOMBIA: Arauca**: Vda Mata Oscura, Mpio Arauquita (6°54'13"N, 71°14'7"W): RC 1587, RC 1760.

*Loxopholis guianense*: **BRASIL: Amapá**: Rio Maracá, boca Ig. Camaipí (0°1'27"S, 51°53'49"W): MZUSP 89309, MZUSP 89310, MZUSP 89312-15, MZUSP 89317-23; Serra do Navio (0°59'0"N, 50°3'0"W): AMNH 138661-63, AMNH 138667, AMNH 138668, AMNH 138695-98, AMNH 138731, AMNH 138732, AMNH 138734-39, AMNH 138752; Vila Nova, mining camp in Rio Vila Nova drainage (0°30'0"N, 51°50'0"W): AMNH 138718; **Amazonas**: São José do Jabote, Igarapé do Tabocal, ME Rio Jatapú (1°52'2"S, 58°13'35"W): CTGAL 142, CTGAL 144, CTGAL 44; **Pará**: As Pedras, Rio Cuminá-Miri: MZUSP 53707, MZUSP 53708, MZUSP 53711, MZUSP 53712, MZUSP 53716, MZUSP 53718; Cruz Alta, 8 Km S de rio Trombetas, Oriximiná. (1°30'56"S, 56°45'50"W): MPEG 15349, MPEG 15365, MPEG 15383, MPEG 15397; Estrada Céu Estrelado / Cruz Alta

(1°33'3"S, 56°44'53"W): MPEG 15427, MPEG 15405; FLOTA Faro, Faro (1°42'0"S, 57°0'11"W): MPEG 27198-200, MPEG 27202-08; FLOTA Trombetas, Óbidos (0°57'0"S, 55°31'0"W): MPEG 27261-67; Oriximiná (1°43'0"S, 55°46'0"W): MZUSP 36003, MZUSP 36005, MZUSP 36007, MZUSP 36016, MZUSP 36017, MZUSP 36019, MZUSP 36020, MZUSP 36022, MZUSP 36031, MZUSP 36033; Platô Bacaba, Oriximiná (1°46'23"S, 56°22'14"W): MZUSP 100020; REBIO Tapirapé, Marabá, PA (5°35'57"S, 50°47'52"W): MZUSP 098352-55; Serra do Acaraí, Oriximiná (1°16'58"N, 58°42'9"W): MPEG 27405, MPEG 27407, MPEG 27409, MPEG 27410, Serra do Acaraí, Oriximiná (1°17'5"N, 58°41'18"W): MPEG 27406, MPEG 27408, MPEG 27411; **FRENCH GUIANA: Cayenne:** Paracou (5°17'0"N, 52°55'0"W): AF 687, AMNH 139939-44, AMNH 139947; Matoury Mont petit (4°53'44"N, 52°21'2"W): AF 1244; Montagne cacao (2°20'57"N, 53°12'57"W): CAHE 002; Montagne tortue grande (4°17'33"N, 52°20'58"W): AF 1502; Petit Saut, Rio Sinnamary (5°3'44"N, 53°3'47"W): MPEG 15824; Savane 14 juillet (3°58'3"N, 51°52'20"W): PG773; St Georges (3°48'40"N, 51°53'22"W): AF 756; **Saint Laurent du Maroni:** On trail between Dorlin and Sophie (3°57'52"N, 53°28'46"W): MCZ 77501; Sophie (3°57'52"N, 53°28'46"W): MCZ 77502-04; Borne 4 (2°12'43"N, 54°21'39"W): BOHE 004; Chutes voltaire (5°1'52"N, 54°5'16"W): AF 828; Flat de la waki (3°11'0"N, 53°28'38"W): WAHE 001; Saül (3°51'29"N, 53°17'37"W): MCZ 149402-04; Saul Galbao carbet (3°37'32"N, 53°16'49"W): AF 992; Saul Limonade (3°33'47"N, 53°11'26"W): AF 1608; St Laurent (5°31'0"N, 53°59'0"W): AF 1591; Trinité aya (4°36'30"N, 53°24'54"W): AF 1207; **GUYANA: Demerara:** Demerara-Ceiba Biological Station, Madewini River (6°29'57"N, 58°13'6"W): AMNH 140962; **Upper Demerara-Berbice:** Berbice River Camp (5°5'6"N, 58°14'14"W): AMNH 152013; **SURINAM: Brokopondo:** Brokopondo (5°1'0"N, 54°59'0"W): AMNH 108777-79, AMNH 119422-23; **Saramacca:** Saramacca (5°43'0"N, 55°38'0"W): AMNH 108780-81; **Sipaliwini:** Raleighvallen-Voltzberg Nature Reserve, Lolopasi side (4°41'9"N, 56°12'14"W): MCZ 152179; Sipaliwini-Pouso Tirio rain forest trail (2°1'48"N, 56°7'34"W): MCZ 152178, MCZ 152181; Vicinity of Voltzberg camp, Raleighvallen-Voltzberg Nature Reserve (4°41'9"N, 56°12'14"W): MCZ 152180; Brownsberg Natuurpark (4°56'34"N, 55°10'33"W): MCZ 149400-01; Lely Mountains (4°16'13"N, 54°44'17"W): MCZ 149539-40, MPEG 17851.

*Loxopholis hexalepis*: **COLOMBIA: Vichada**: Puerto Carreño (6°11'0"N, 67°29'0"W): AMNH 120141, Puerto Carreño (6°12'43"N, 67°30'50"W): JDL 31306-07, JDL 31356, JDL 31439-40, JDL 31442; **VENEZUELA: Amazonas**: Neblina Expedition, Puerto Ayacucho (5°40'0"N, 67°37'0"W): AMNH 133650-54.

*Loxopholis osvaldoi*: **BRASIL: Amazonas**: Apiacás (9°34'4"S, 57°20'34"W): MZUSP 81651-58; Cachoeira das Pombas, Margem direita Rio Aripuanã (6°24'0"S, 60°21'0"W): MTR 10141, MTR 10150, MTR 10153, MTR 10170, MTR 10211, MTR 10237-38; Cachoeirinha, Margem Esquerda Rio Madeira (5°29'21"S, 60°50'3"W): INPA 12155, INPA 12157-65; Comunidade São Sebastião dos Bargas, Margem Direita Rio Madeira (3°47'23"S, 59°2'6"W): SMS602; E.E. Anavilhanas (2°29'19"S, 60°52'35"W): MPEG 28702; Fazenda Walmir, Vila Sampaio, Margem Esquerda rio Madeira. (3°42'51"S, 59°8'37"W): SMS699, SMS 718-19; Grid PPBIO da REBIO Uatumã (1°46'50"S, 59°13'44"W): INPA 20641; Itapinima, Marg. Direita Rio Madeira (5°24'38"S, 60°43'37"W): INPA 12156, INPA 12166-67; Lago Chaviana, Itapuru, margem direita Rio Purus (4°18'27"S, 61°48'49"W): MTR 18712-13, MTR 18803, MTR 18970; Lago de Balbina (1°46'50"S, 59°13'44"W): INPA 20637-40, INPA 20642; Lindóia, LT Oriximiná-Cariri (2°57'13"S, 58°57'7"W): MPEG 29369; Lindóia, LT Oriximiná-Cariri (2°57'57"S, 58°57'25"W): MPEG 29367, Lindóia, LT Oriximiná-Cariri (2°58'27"S, 58°57'39"W): MPEG 29366, Manaus, Campus INPA (3°5'49"S, 59°59'9"W): MZUSP 51296, MZUSP 57330; Moioyamba, margem direita, Rio Purus (4°43'39"S, 62°7'43"W): MTR 19060, MTR 19090, MTR 19425, MTR 19428; Pitinga- Camburão, Presidente Figueiredo (0°47'51"S, 60°7'32"W): INPA 932; REMAN, Manaus (3°8'19"S, 59°56'54"W): INPA 17836, INPA 17839, INPA 17848-49, INPA 18394, INPA 18397, INPA 18401, INPA 18406; Rio Preto da Eva, Amazonat Jungle Lodge (2°20'30"S, 59°12'52"W): PI 06, PI 46; Santa Barbara, Borba (4°1'43"S, 59°6'46"W): MPEG 16965; São João do Lago da Velha (2°1'55"S, 58°13'31"W): CTGAL 036, CTGAL 121; São José das Pombas, margem esquerda do Rio Aripuanã (6°25'0"S, 60°22'0"W): MTR 10158, MTR 10192-93, MTR 10196-97; São Tomé / Bragança, Rio Paraconi, Maués (3°55'8"S, 58°24'20"W):

MPEG 27653; São Tomé / Bragança, Rio Paraconi, Maués (3°56'51"S, 58°26'36"W):  
MPEG 27647-52; São Tomé. Igarapé Tabacal. Rio Paraconi (3°55'8"S, 58°24'20"W):  
MPEG 27646; Silves (2°42'15"S, 58°14'57"W): INPA 20113-16; ZF2 e INPA, 60 Km N de  
Manaus (2°35'41"S, 60°12'54"W): MPEG 15815; **Mato Grosso**: Aripuanã (10°16'18"S,  
59°23'17"W): MZUSP 81585-86, MZUSP 82704, MZUSP 82707, MZUSP 82711,  
MZUSP 82720, MZUSP 82722, MZUSP 82730-32, MZUSP 82736; Reserva Ecológica  
Iquê, Rod. AR-1, Vilhena-Juina (12°3'17"S, 59°30'55"W): MPEG 13863; **Pará**: Área de  
Prospecção mineral da Alcoa. (2°36'36"S, 56°13'11"W): MPEG 20780, MPEG 20788-89,  
MPEG 20798, MPEG 20827, MPEG 20830, MPEG 20855; Barroso (2°28'18"S,  
56°0'44"W): MPEG 25249, MPEG 28508; Capiranga (2°29'18"S, 56°9'21"W): MPEG  
25248; FLONA Sacará-Taquera, Porto Trombetas (1°47'2"S, 56°30'5"W): MPEG 28343-  
44; FLOTA Faro, Faro (1°42'0"S, 57°0'11"W): MPEG 27219-20; FLOTA Faro, Faro  
(1°42'0"S, 57°0'49"W): MPEG 27225; FLOTA Faro, Faro (1°42'0"S, 57°0'9"W): MPEG  
27221, Itaituba, Mina do Tocantinzinho (6°2'45"S, 56°18'13"W): MPEG 29053-55, MPEG  
29057; Itaituba, PARNA Amazônia (5°25'57"S, 57°26'5"W): MPEG 29416-17, MPEG  
29420-21, MZUSP 102163, MZUSP 102164, MZUSP 102165; Mutum (2°36'46"S,  
56°11'35"W): MPEG 25255; Mutum (2°36'48"S, 56°11'40"W): MPEG 25250; Novo  
Progresso, BR163 (7°8'15"S, 55°37'38"W): MPEG 28449; Novo Progresso, BR163  
(8°21'1"S, 55°26'35"W): MPEG 28453; PARNA da Amazônia (4°29'3"S, 56°16'18"W):  
MPEG 29462, PARNA da Amazônia (4°33'7"S, 56°18'8"W): MPEG 22276, PARNA da  
Amazônia (4°40'27"S, 56°32'52"W): MPEG 30024; PARNA da Amazônia, Trilha da  
Capelinha, Itaituba (4°37'30"S, 56°23'19"W): MPEG 21972; PARNA da Amazônia.  
Acampamento Base Sapopema (4°40'27"S, 56°32'52"W): MPEG 22274-76; PARNA da  
Amazônia. Rio Tapajós. Base do IBAMA 1 (4°28'14"S, 56°17'4"W): MPEG 22278;  
Plateau Capiranga (2°28'18"S, 56°9'21"W): MPEG 26527; Sítio Céu Estrelado, rio  
Nhamundá, Faro (2°2'42"S, 56°42'42"W): MPEG 15313; **Rondonia**: Cachoeira Nazaré,  
Rio Machado (9°45'0"S, 61°55'0"W): MZUSP 66339; Faz. Rio Candeias (8°47'54"S,  
63°41'40"W): MPEG 12927; Fazenda Jaburi, Espigão d'Oeste (11°38'2"S, 60°43'51"W):  
MPEG 21486, MPEG 21492, MPEG 21938; Jaci-Paraná (9°17'12"S, 64°24'47"W):  
MPEG 14346; Montenegro/Cacaulandia (10°16'59"S, 63°19'0"W): MZUSP 89464,

MZUSP 89466-69; Nova Colina (10°47'42"S, 61°41'36"W): MZUSP 62168; Ouro Preto d'Oeste (10°14'0"S, 62°13'0"W): MPEG 14066; Ouro Preto d'Oeste (11°4'2"S, 62°12'56"W): MPEG 13920, MPEG 14057, PAREST Guajará Mirim (10°38'29"S, 64°48'39"W): MPEG 20557; Pimenta Bueno, Rio Comemoração/Rondon II (11°40'40"S, 61°11'15"W): MPEG 18080; Uruá (PARNA Amazônia) (4°32'38"S, 56°18'40"W): MZUSP 53643.

*Loxopholis parietale*: **COLOMBIA: Amazonas**: Puerto Nariño (3°46'20"S, 70°22'30"W): MCZ 154012-13, MCZ 154536-37; Rio Amaca Yacu (3°38'20"S, 70°27'46"W): MCZ 154535; **Caqueta**: Villa Maria, hacienda a orillos del Rio Orteguaza, afluente del Rio Caquetá app 45 Km Sul de Florencia (1°12'6"N, 75°31'38"W): MCZ 61156; **Putumayo**: C.a. 10 Km (airline) S. Mocoa (1°3'33"N, 76°38'17"W): AMNH 106635-36; C.a. 7 Km (airline) SE. Mocoa (1°5'31"N, 76°37'12"W): AMNH 106637; **ECUADOR: Cuyabeno**: C.E.P.E. oil field near Tarapoa, near Vila Agrio (0°7'59"S, 76°25'0"W): MCZ 163234; **Morona-Santiago**: Ashuara village on Rio Macuma. (2°58'0"S, 77°50'0"W): AMNH 113939-58; Cusuime, Rio Cusuime. (2°40'0"S, 77°42'0"W): AMNH 113774-814; **Napo**: 6.5 Km E.S.E. of Puerto Misahualli, at La Cruz Blanca on A. Suarez land (1°3'12"S, 77°36'7"W): MCZ 171943-45, MCZ 173990-96, MCZ 178332; Braga Cocha (0°0'0", 0°0'0"): MCZ 93416-17; Limon Cocha (0°24'0"S, 76°37'0"W): MCZ 86643-44; Sta. Cecilia (0°3'0"N, 76°58'0"W): MCZ 100067; **Pastaza**: Pastaza, entre Sarayacu e Canelos (1°35'0"S, 77°37'0"W): MZUSP 9277; Sarayacu (1°44'5"S, 77°28'55"W): MCZ 38442; **Sucumbios**: Garza Cocha, Cuyabeno (0°28'53"S, 75°20'39"W): CORBIDI 17; Gueppicillo (0°10'38"S, 75°40'33"W): CORBIDI 260, CORBIDI 266, CORBIDI 267, CORBIDI 300; **PERU: Amazonas**: Distrito Río Santiago, Quebrada Katerpiza (4°1'13"S, 77°35'0"W): CORBIDI 9522; Loreto: 3 Km airline SSW Mishana on Rio Nanay. (3°56'0"S, 73°36'0"W): AMNH 147686; 3 Km NE Pebas on Rio Amazonas. (3°9'0"S, 71°45'0"W): AMNH 147684-85; Aguas Negras (0°6'1"S, 75°10'4"W): CORBIDI 281, CORBIDI 283, CORBIDI 285; Andoas (2°21'4"S, 75°48'58"W): CORBIDI 1551, Andoas (2°30'24"S, 76°5'20"W): CORBIDI 4996; Andoas (2°42'15"S, 76°18'46"W): CORBIDI 1583, Belén-1 (3°42'35"S, 74°32'28"W): CORBIDI 10163; Capahuari Norte (2°39'51"S,

76°30'4"W): CORBIDI 4900; Distrito Morona, Pongo Chinim (3°6'46"S, 77°46'34"W): CORBIDI 9346; Estirón, Rio Ampiyacu (3°20'0"S, 72°1'0"W): MCZ 133258-59, MPEG 2248-49, MZUSP 13947-54, MZUSP 13958, MZUSP 13961-62; headwaters of Río Loretoyacu, Yagua Indian Village. (3°34'3"S, 70°35'49"W): AMNH 113129-32; Iquitos (3°44'0"S, 73°16'0"W): AMNH 56260; Moropon (3°53'12"S, 73°44'7"W): MCZ 151759, MZUSP 39437; Moropon, Rio Nanay (3°53'12"S, 73°44'7"W): MZUSP 2829-94; Paraiso, Rio Itaya (3°48'0"S, 73°17'0"W): MZUSP 28340-41; Redondococha (0°34'16"S, 75°13'9"W): CORBIDI 290, CORBIDI 294; Rio Ampiyacu, Estirón (3°20'0"S, 72°1'0"W): AMNH 125233, AMNH 113102; Rio Itaya, Iquitos Region (3°48'0"S, 73°17'0"W): AMNH 56261, Rio Itaya, Iquitos Region (4°16'0"S, 73°36'0"W): AMNH 56262; San Jacinto (2°19'51"S, 75°51'49"W): CORBIDI 1140-41, CORBIDI 1168, CORBIDI 1171; Sargento Puño (3°13'7"S, 77°35'4"W): CORBIDI 8710; **Loreto**: Andoas (2°21'4"S, 75°48'58"W): CORBIDI 4640, Andoas (2°42'15"S, 76°18'46"W): CORBIDI 4702; Jibarito (2°44'8"S, 76°1'54"W): CORBIDI 6462; San Jacinto (2°19'51"S, 75°51'49"W): CORBIDI 1142.

*Loxopholis percarinatum*: **BRASIL**: **Amapá**: 42km E Laranjal do Jari (0°50'24"S, 52°8'9"W): MTR 13981; Vila Nova, mining camp in Rio Vila Nova drainage (0°30'0"N, 51°50'0"W): AMNH 138720; **Amazonas**: Acampamento Gavião (2°12'32"S, 60°1'31"W): MCZ 168977; APA Tapuruquara (0°2'38"N, 64°45'24"W): MPEG 30963-64; Cucuí (2°42'49"N, 66°51'25"W): MPEG 24810; E.E. Anavilhanas (2°29'19"S, 60°52'35"W): MPEG 28705, MPEG 28706, E.E. Anavilhanas (2°39'58"S, 61°9'51"W): MPEG 28703, MPEG 28704, E.E. Anavilhanas (3°38'1"S, 61°52'33"W): MPEG 28707-08; Lago Chaviana, Itapuru, margem direita Rio Purus (4°18'27"S, 61°48'49"W): MTR 18811, MTR 18899, MTR 18922; Comunidade São Sebastião dos Bargas, Margem direita Rio Madeira (3°47'23"S, 59°2'6"W): SMS 647, SMS 703; Mojobamba, margem direita, Rio Purus (4°43'39"S, 62°7'43"W): MTR 19391, MTR 19424; REMAN, Manaus (3°8'19"S, 59°56'54"W): INPA 17835, INPA 17842-43, INPA 17850-52, INPA 18396, INPA 18399-400, INPA 18405, INPA 18409; Santa Isabel do Rio Negro, Rio Ayuanã (0°35'57"S, 64°54'14"W): INPA 31170-71; Santa Isabel do Rio Negro, Rio Daraá (0°23'59"S, 64°48'1"W): INPA 31128, INPA 31130-37, INPA 31139-41, INPA 31143-44, INPA 31146-

52, INPA 31154, INPA 31156-58, INPA 31162, INPA 31164-66,; São Gabriel da Cachoeira (0°6'45"S, 67°3'4"W): INPA 12765, INPA 15088-105, INPA 15815-17, INPA 22725-38; São João do Lago da Velha (2°1'55"S, 58°13'31"W): CTGAL 113, CTGAL 27; Tapuruquara, Rio Negro (0°24'41"S, 65°0'25"W): MPEG 1937-38; **Maranhão**: São Pedro das Águas Brancas (5°7'17"S, 48°25'46"W): MZUSP 95167; **Pará**: Cachoeira do Piriá (1°56'25"S, 46°26'20"W): MPEG 31779; Moraes de Almeida-Terra do Meio (6°6'0"S, 55°18'5"W): MPEG 25089; Santarém (3°8'44"S, 54°50'45"W): MPEG 17455, Santarém (3°8'59"S, 54°50'23"W): MPEG 17525, Santarém (3°9'12"S, 54°49'57"W): MPEG 17573, MPEG 17596, MPEG 17598, Santarém (3°9'13"S, 54°49'57"W): MPEG 17601, Santarém (3°9'39"S, 54°49'50"W): MPEG 17635, MPEG 17651, MPEG 17654; Sitio Maguari (1°21'11"S, 48°14'1"W): MPEG 28537; UHE Belo Monte (3°25'41"S, 51°35'56"W): BM 685, BM 688; UHE Belo Monte, Margem Esquerda Rio Xingú (3°22'35"S, 51°57'28"W): MPEG 19246, MPEG 19252, MPEG 19253, MPEG 19277, MPEG 19313, MPEG 19357, MPEG 19364, UHE Belo Monte, Margem Esquerda Rio Xingú (3°29'12"S, 51°48'5"W): MPEG 19417; **Rondonia**: UHE Jirau (9°32'0"S, 64°58'0"W): MTR 18102; UHE-Jirau (9°16'57"S, 64°37'42016"W): MPEG 27909; **Roraima**: Colônia Apiau (Igarapé Serrinha) (2°33'44"N, 61°18'30"W): MZUSP 67730; ESEC Maracá, Balsa (3°20'58"N, 61°25'22"W): MTR 20636, MTR 20644; ESEC Maracá\_1 (3°21'34"N, 61°26'2"W): MTR 20462-63, MTR 20651-52; ESEC Maracá\_2 (3°22'33"N, 61°26'59"W): INPA 18937-38, INPA 18940, INPA 18942, MTR 20416, MTR 20417; Ilha de Maracá (3°21'34"N, 61°26'2"W): MZUSP 79306, MZUSP 95224; PARNA Viruá (1°30'0"N, 61°9'0"W): INPA 18945, INPA 18947, INPA 18950-51, INPA 19068, INPA 19275, INPA 19406; Serra da Maroquinha (2°21'32"N, 61°21'44"W): MTR 23062, MTR 23097, MTR 23117; Serra do Apiaú (2°26'29"N, 61°26'11"W): SMS 823-824, SMS 990; Serra do Tepequém (3°45'14"N, 61°43'2"W): MTR 20961; Vila de Pacaraima (4°28'16"N, 61°9'20"W): MTR 20742; **Tocantins**: Palmeirante (7°51'27"S, 47°56'26"W): ESTR 0188; **GUYANA**: **Cuyuni-Mazaruni**: Kamakusa (5°40'0"N, 60°8'0"W): AMNH 25082-83; **Demerara**: Ceiba Biological Station, Madewini River, ca 3 mi (linear) E Timehri Airport (6°29'57"N, 58°13'6"W): AMNH 152337; **Essequibo**: Isheartun. (2°30'0"N, 59°15'0"W): AMNH 141322-26, AMNH 61418-19; **Mazaruni-Potaro**: Kartabo



(6°21'0"N, 58°41'0"W): AMNH 137370-71, AMNH 21263, AMNH 21266, AMNH 21268, AMNH 46433-36, MCZ 45956-57; **Potaro-Siparuni**: Iwokrama (4°40'0"N, 58°41'0"W): AMNH 148656-65; Magdalen's Creek Camp, near (± 300 yds) NW bank of the Konawaruk River (ca 25 mi (linear) WSW Mabura Hill) (5°13'7"N, 59°2'43"W): AMNH 152027-29, AMNH 152032-36; **Upper Demerara-Berbice**: Aramatani Creek. (5°41'14"N, 57°54'59"W): AMNH 141888; Berbice River Camp (5°5'6"N, 58°14'14"W): AMNH 152010-12, AMNH 152014-15, AMNH 152017-19; Dubulay Ranch on the Berbice River. (5°40'55"N, 57°51'32"W): AMNH 141889-90; **Upper Takutu-Upper Essequibo**: Kuyuwini Landing. (2°5'0"N, 59°15'0"W): AMNH 57455; **VENEZUELA: Amazonas**: Camp La Culebra (3°43'47"N, 65°48'6"W): MCZ 58347; La Culebra, Upper Cunucunuma river (3°43'47"N, 65°48'6"W): MCZ 101884; 12 mi. N Esmeralda (3°20'0"N, 65°33'0"W): AMNH 39320; Mt. Duida, Rio Pescada. (3°20'0"N, 65°33'0"W): AMNH 36637; Neblina Base Camp on Rio Mawarinuma. (0°50'0"N, 66°10'0"W): AMNH 133655; Pto. Chimo Camp, 160-180 m, Rio Mawarinuma at mouth Cañon Grande of Cerro de la Neblina (5-6 km airline E Neblina Base Camp). (0°50'0"N, 66°6'0"W): AMNH 127816, AMNH 129879; Santa Barbara (junction Rio Orinoco & Rio Ventuari) 100 m elev (3°56'53"N, 67°3'52"W): AMNH 117892; Southwest sector Cerro Yapacana (3°40'40"N, 66°48'48"W): AMNH 117891; Tapirapeco Exped. Base Camp, upper Rio Mavaca. (2°2'0"N, 65°7'0"W): AMNH 134179-82; **Monagas**: Monagas, Caripito (10°8'0"N, 63°6'0"W): AMNH 137617, AMNH 137619-26.

*Loxopholis rugiceps*: **COLOMBIA: Antioquia**: Carepa, finca Tulenapa. (7°46'0"N, 76°40'0"W): JDL 30006; Remedios, San Martin (7°1'49"N, 74°41'34"W): MCZ 165312; **Magdalena**: Fundación (10°30'58"N, 74°9'37"W): MCZ 16834-35; Las Pavas (10°18'23"N, 74°39'49"W): MCZ 16836; Los Cocos, Isla de Salamanca (10°57'0"N, 74°24'0"W): MZUSP 55686; Rio Frio (10°54'46"N, 74°10'14"W): MCZ 29720, MCZ 29724-25; Sta. Marta Mts. (11°4'10"N, 74°11'59"W): MCZ 16837; Tayrona Canaveral (11°18'55"N, 74°7'3"W): MCZ 160179; **PANAMA: Balboa**: Panama Pearl Ids (8°35'0"N, 79°1'0"W): AMNH 108684; **Canal Zone**: Juan Mina, Canal Zone (9°10'0"N, 79°39'0"W): AMNH 71700-01; **Colon**: Fort Randolph, Canal Zone (9°23'4"N, 79°53'16"W): MCZ

18893; Gatun, Canal Zone (9°17'30"N, 79°56'55"W): MCZ 22321; Curundu, Canal Zone (8°59'13"N, 79°32'34"W): MCZ 86972; Fort Clayton, Canal Zone (9°1'0"N, 79°34'0"W): MCZ 24392; Juan Diaz (9°1'52"N, 79°25'51"W): MCZ 34379.

*Loxopholis snethlageae*: **BRASIL: Amazonas**: Açai, Rio Içá (2°53'13"S, 68°22'15"W): MTR 36173; Comunidade Botafogo, Rio Juruá (3°11'36"S, 65°57'56"W): INPA 15945-46; Comunidade Cachoeirinha, Rio Içá (2°54'51"S, 68°19'52"W): MTR 35893, MTR 36373; Comunidade Cuiauí, Rio Içá (2°53'10"S, 68°22'19"W): MTR 36313; Comunidade Cuiauí, Rio Içá (2°53'13"S, 68°22'1"W): MTR 35896; Comunidade Cuiauí, Rio Içá (2°54'51"S, 68°19'52"W): MTR 36019; Lago Miuá (3°40'59"S, 62°6'30"W): MZUSP 17314; Porto Urucu (5°20'59"S, 65°47'1"W): MPEG 15858, MPEG 22217; Porto Urucu (5°45'5"S, 66°3'35"W): MPEG 21535, RDS Cujubim (5°5'18"S, 69°12'59"W): MPEG 28147; RESEX do Baixo Juruá (3°11'36"S, 65°57'56"W): INPA 22953-56; Rio Içá (2°53'1"S, 68°22'1"W): MTR 36025; São Pedro, Rio Içá (2°53'0"S, 68°20'59"W): MTR 36641, São Pedro, Rio Içá (3°1'52"S, 68°52'39"W): MTR 36734; São Pedro, Rio Içá (3°1'58"S, 68°53'3"W): MTR 36580, **COLOMBIA: Amazonas**: La Providencia, Rio Miriti-Parana (1°12'29"S, 69°53'21"W): MCZ 150176; **PERU: Loreto**: Cabeceras del Ere-Algodon (1°40'44"S, 73°43'10"W): CORBIDI 12635, CORBIDI 12636; Curupa (Rio Yanayacu-Cuenca del Napo) (2°53'7"S, 73°1'4"W): CORBIDI 5967.

*Loxopholis southi*: **COLOMBIA: Cauca**: Quebrada Guanguí, 0,5 km above Rio Patia. (1°54'0"N, 77°59'0"W): AMNH 109699; **Choco**: 2 km above Playa de Oro, upper Rio San Juan. (5°19'0"N, 76°25'0"W): AMNH 107264-65; Quebrada Docordó, c.a. 10 km above jctn with Rio San Juan. (4°33'0"N, 77°0'0"W): AMNH 107263; Quebrada Pangala, lower Rio San Juan (4°15'0"N, 77°0'0"W): AMNH 123709; Quebrada Vicordo, c.a. 5 km above Noanamá, Rio San Juan. (4°42'0"N, 76°53'0"W): AMNH 107259-62; **COSTA RICA: Limon**: Suretka (9°34'0"N, 82°55'59"W): MCZ 18917; **PANAMA: Bocas del Toro**: 7.1 km (airline) WSW Chiriquí Grande. (8°55'0"N, 82°10'0"W): AMNH 123281-82; East slope Cerro Miramar. (8°59'13"N, 82°14'58"W): AMNH 123280; Northeast end Isla

Popa, Coal Mine. (9°13'0"N, 82°7'0"W): AMNH 123279; **Chiriqui**: Progreso (8°26'13"N, 82°49'58"W): MCZ 18915; **Coclé**: Continental Divide N. El Copé (8°41'0"N, 80°36'0"W): AMNH 117788; **Colon**: 2.5 Km N Agua Clara rain guage on Santa Rita Lumber road (E of Colon) (9°19'17"N, 79°46'14"W): MCZ 133721; Rio Boquerón ab. 2.5 km (airline) N. Peluca Hydrographic Station. (9°18'0"N, 79°34'0"W): AMNH 110560; Barro Colorado Island, Canal Zone (9°9'24"N, 79°50'41"W): MCZ 22298; Cerro Campana (8°43'1"N, 79°54'50"W): MCZ 127830; Cerro Azul region, Gorgas Memorial lab., "Sloth Camp" (9°10'0"N, 79°25'0"W): AMNH 119873; Km 14.6 on El Llano-Cartí Rd; 370 m. (9°16'0"N, 79°3'0"W): AMNH 110559; **Veraguas**: 5-6 mi NW (via rd) Santa Fe (8°32'24"N, 81°9'25"W): AMNH 147803, AMNH 120012.

**Apêndice 5.** Código da função `distfilogeo()` desenvolvida no R durante esta tese para realizar o teste de Mantel

***distfilogeo***

***package:unknown***

***R Documentation***

***Teste de correlação de Mantel entre distâncias geográficas e distâncias filogenéticas de amostras***

**Description:**

A função possui três passos principais: 1. Primeiro ela calcula as distâncias geográficas par a par entre as localidades de n amostras a partir de uma matriz (fornecida pelo usuário) contendo as coordenadas das amostras; 2. Calcula as distâncias filogenéticas par a par entre as mesmas amostras a partir de um arquivo da classe "phylo" (criado a partir do pacote "ape"), que corresponde a uma árvore filogenética; 3. Calcula o coeficiente de correlação de Pearson entre as matrizes de distâncias geográficas e filogenéticas, permuta n vezes a matriz de distâncias geográficas, recalcula o coeficiente de Pearson a cada permutação, plota um histograma com os valores dos coeficientes permutados e fornece a proporção de valores que são menores ou maiores que o valor observado.

Decidi usar a distância filogenética em termos de comprimento de ramos ao invés da distância genética, amplamente usada. São duas informações diferentes. A distância genética é uma medida da diferença genética entre dois organismos que, por não estar situada em um contexto filogenético, pode ser resultado de uma homoplasia (organismos próximos filogeneticamente mas com grande distância genética ou organismos distantes filogeneticamente, porém com diferenças genéticas mínimas geradas por convergência). Já a distância filogenética é uma medida da distância evolutiva entre dois organismos, de acordo com determinada hipótese (árvore) filogenética.

### **Usage:**

```
distfilogeo(y,x,dec=TRUE, nperm=1000)
```

### **Arguments:**

y: Data Frame contendo as coordenadas de cada localidade.

x: Objeto da classe "phylo", proveniente do pacote "ape".

dec: se TRUE, indica que os dados de coordenadas estão em graus decimais. Se FALSE, as coordenadas estão em graus, minutos e segundos (GMS) (ver Details).

nperm: Número de vezes que a planilha de distância geográfica será randomizada.

### **Details:**

Em y, dois formatos de coordenadas são aceitos, graus decimais e graus, minutos e segundos (GMS). No primeiro caso (graus decimais), o data frame deve obrigatoriamente seguir a seguinte estrutura: a primeira coluna deve conter o nome das localidades (ou amostras), a segunda coluna deve conter os valores de latitudes e a terceira coluna os valores de longitude. No caso do usuário entrar com as coordenadas em GMS, o data frame deve obrigatoriamente seguir a seguinte estrutura: a primeira coluna deve conter o nome das localidades (ou amostras), a segunda coluna os valores de graus para latitude, a terceira os valores de minutos para latitude, a quarta os

valores de segundos para latitude, a quinta deve conter o quadrante da latitude (N ou S), escrito em caixa alta. A sexta, sétima, oitava e nona colunas seguem a mesma estrutura da latitude, porém com os dados de longitude. o quadrante da longitude aceita W ou E, ambos em caixa alta.

x corresponde a uma árvore filogenética obrigatoriamente enraizada, já que o algoritmo não funciona com arvores desenraizadas. É importante checar se a árvore contém terminais no mesmo número e na mesma ordem que as amostras (ou localidades) da planilha de coordenadas. É importante também que o arquivo que gerou o objeto contenha informações sobre os comprimentos dos ramos da árvore. Normalmente o arquivo é do tipo .nex e foi lido no R a partir da função "read.nexus" do pacote ape.

#### **Value:**

É gerado um histograma contendo os valores dos coeficientes calculados após as permutações. Uma linha vermelha indica a posição do coeficiente observado no histograma, além de um texto indicando a proporção de valores permutados maiores e menores do que o valor observado. Também é gerada uma lista contendo:

comp1 : Matriz quadrática de distâncias geográficas par a par

comp2 : Matriz quadrática de distâncias filogenéticas par a par

#### **Warning:**

Em y, quando entrando com dados em GMS, a função não avisará se o usuário estiver errando nos valores dos quadrantes que são aceitos (N ou S para latitude e W ou E para longitude, todos em caixa alta). Por exemplo, "s" em caixa baixa será entendido como quadrante norte, gerando erro no cálculo das distâncias geográficas.

A função também não avisará se o número e a sequência das amostras ou localidades estiver diferente da lista de terminais da árvore filogenética. Para checar a ordem dos terminais, use a indexação \$tip.label antes de rodar a análise.

**Author(s):**

Sergio Marques de Souza

sergio.bogao@gmail.com

**References:**

Mantel, N. (1967). "The detection of disease clustering and a generalized regression approach". *Cancer Research* 27 (2): 209–220.

Mantel Test. [http://en.wikipedia.org/wiki/Mantel\\_test](http://en.wikipedia.org/wiki/Mantel_test)

**See Also:**

Classe de objetos "phylo" no pacote ape, assim como a função "read.nexus".  
Árvores geradas a partir do software MrBayes já são arquivos .nexus e podem ser lidas diretamente com a função "read.nexus"

**Examples:**

```
teste<-read.nexus("arvore.con.tre")
```

```
teste.gms<-read.csv("coordenadas_teste_m.csv", as.is=T)
```

```
distfilogeo(teste.gms, teste, dec=FALSE, nperm=5000)
```

**Código da função:**

```
distfilogeo<-function(y,x,dec=TRUE, nperm=1000)
```

```
{
```

```
## Calculo da matriz quadrática de distâncias geográficas##
```

```
if(dec==FALSE)# indica o caminho a seguir pelo algoritmo caso o usuário tenha  
entrado com as coordenadas em graus, minutos e segundos
```

```
{
```

```

y$lat_dec<-(y[,2]+(y[,3]/60)+(y[,4]/3600)) #Cria coluna com o valor da latitude em
graus decimais

for (i in 1:length(y$lat_dec))# Olha para cada valor da coluna de graus decimais
{
  if(y[i,5]=="S")# Checa se a latitude está no quadrante sul
  {
    y$lat_dec[i]<-y$lat_dec[i]*-1# Caso esteja no sul, multiplica o valor por -1
  }
}

y$long_dec<-(y[,6]+(y[,7]/60)+(y[,8]/3600)) #Cria coluna com o valor da longitude em
graus decimais

for (i in 1:length(y$lat_dec))# Olha para cada valor da coluna de graus decimais
{
  if(y[i,9]=="W")# Checa se a longitude está no quadrante oeste
  {
    y$long_dec[i]<-y$long_dec[i]*-1#Caso esteja no oeste, multiplica o valor por -1
  }
}
}

else# as coordenadas já estão em graus decimais
{
  colnames(y)<-c("locality","lat_dec","long_dec")# muda o nome das colunas do data
frame
}

y$lat_dec<-y$lat_dec*(pi/180)# Transforma em radianos
y$long_dec<-y$long_dec*(pi/180)# Transforma em radianos

```

```
dist.mat<-matrix(NA,length(y$lat_dec),length(y$lat_dec),dimnames=list((y[,1]),(y[,1])))#  
Cria a matriz quadrática com os NA's
```

```
r<-6371 # Raio aproximado da terra, em kilometros(a medida resultante será em Km  
também)
```

```
for(a in 1:(length(y$lat_dec)-1))# "for" de nivel superior, eixo x da matriz simétrica  
{  
  for(b in (a+1):(length(y$lat_dec)))# "for" de nivel inferior, faz as medidas uma a uma,  
  correspondente ao eixo y da matriz simétrica  
  {  
    dlat<-(y$lat_dec[b]-y$lat_dec[a])# diferença entre as latitudes das duas  
    coordenadas  
    dlong<-(y$long_dec[b]-y$long_dec[a])# diferença entre as longitudes das duas  
    coordenadas  
    z<-  
    2*r*asin(sqrt((sin(dlat/2)^2)+cos(y$lat_dec[a])*cos(y$lat_dec[b])*(sin(dlong/2)^2)))#  
    Aplicação da formula de Haversine, que calcula as distâncias geográficas  
    round(z)# Dá o numero de casas decimais do valor de distancia geográfica  
    dist.mat[b,a]<-z # Preenche a matriz quadráticas com os valores de distancias  
    calculados  
  }  
}  
##Calculo da matriz quadratica de distancias filogenéticas##  
dist.filo<-cophenetic(x)  
dist.filo[upper.tri(dist.filo,diag=T)]<-NA
```

```
## Calculo do coeficiente de correlação de Pearson entre as matrizes de distâncias  
geográficas e filogenéticas, além de permutar os dados e plotar em um histograma##
```



```
vet.filo<-dist.filo[lower.tri(dist.filo)]# Faz um vetor com os valores de distancia filogenética entre os terminais
```

```
vet.geo<-dist.mat[lower.tri(dist.mat)]# Faz um vetor com os valores de distancia geográfica entre os terminais
```

```
med.filo<-mean(vet.filo)# Calcula a media das distancias filogenéticas
```

```
med.geo<-mean(vet.geo)# Calcula a media das distancias geográficas
```

```
cima<-rep(NA,length(vet.filo))# Cria um vetor que irá ser o numerador da formula do coeficiente de correlação de Pearson
```

```
t1den<-rep(NA,length(vet.filo))# Cria um vetor que irá ser o primeiro termo do denominador da formula do coeficiente de correlação de Pearson
```

```
t2den<-rep(NA,length(vet.filo))# Cria um vetor que irá ser o segundo termo do denominador da formula do coeficiente de correlação de Pearson
```

```
for(l in 1:length(vet.filo))#for que irá calcular o coeficiente de correlação de Pearson
```

```
{
```

```
  cima[l]<-(vet.filo[l]-med.filo)*(vet.geo[l]-med.geo)# Calculo do numerador
```

```
  t1den[l]<-(vet.filo[l]-med.filo)^2# Calculo do primeiro termo do denominador
```

```
  t2den[l]<-(vet.geo[l]-med.geo)^2# Calculo do segundo termo do denominador
```

```
}
```

```
r.pearson<-sum(cima)/(sqrt(sum(t1den))*sqrt(sum(t2den)))# Calculo do coeficiente de correlação de Pearson
```

```
r.permut<-rep(NA,nperm)# Vetor que irá conter os dados dos coeficientes calculados após a aleatorização dos dados
```

```
for (q in 1:nperm)# for que irá aleatorizar uma das matrizes, recalculando o coeficiente de pearson, e jogar o resultado no vetor r.permut
```

```
{
```

```
  vet.geo.per<-sample(vet.geo)# aleatorizando o vetor vet.geo
```

```

for(u in 1:length(vet.filo))# Novo calculo do coeficiente de correlação de Pearson,
mesmos calculos de acima
{
  cima[u]<-(vet.filo[u]-med.filo)*(vet.geo.per[u]-med.geo)# Calculo do numerador
  t1den[u]<-(vet.filo[u]-med.filo)^2# Calculo do primeiro termo do denominador
  t2den[u]<-(vet.geo.per[u]-med.geo)^2# Calculo do segundo termo do denominador
}

r.permut[q]<-sum(cima)/(sqrt(sum(t1den))*sqrt(sum(t2den)))# jogando o resultado
aleatorizado no vetor r.permut
}

menores<-length(which(r.permut<r.pearson))/nperm# numero de valores aleatórios
que são menores que o calculado

maiores<-length(which(r.permut>r.pearson))/nperm# numero de valores aleatórios que
são maiores que o calculado

resultados<-list ()# Cria uma lista chamada "planilhas"
resultados$Distâncias_geográficas<-dist.mat# Coloca o objeto "dist.mat" na lista
resultados$Distâncias_filogenéticas<-dist.filo# Coloca o objeto "dist.filo" na lista
resultados$r.permut<-r.permut
resultados$r.pearson<-r.pearson
resultados$maiores<-maiores
resultados$menores<-menores
return(resultados)# retorna a matriz de distâncias filogenéticas e geográficas
}

```