Taís Machado

Filogenia molecular das espécies de *Bothrops* do grupo *neuwiedi* (Serpentes, Viperidae)

Molecular phylogeny of the *Bothrops neuwiedi* species group (Serpentes, Viperidae)

Instituto de Biociências Universidade de São Paulo

> São Paulo 2010

Taís Machado

Filogenia molecular das espécies de *Bothrops* do grupo *neuwiedi* (Serpentes, Viperidae)

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências Biológicas, na Área de Biologia/Genética.

Orientadora: Dra. Maria José de Jesus Silva

São Paulo 2010 Machado, Taís Filogenia molecular das espécies de *Bothrops* do grupo *neuwiedi* (Serpentes, Viperidae) 104 páginas

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. *Bothrops neuwiedi* 2. Filogenia molecular 3. DNA mitocondrial I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Dra. Maria José de Jesus Silva Orientadora

Ao Ricardo e à minha família, com todo amor que houver nesta vida.

"The molecular perspectives do not supplant traditional approaches to the study of natural history and evolution, but rather enrich our understanding of life."

John C. Avise (2004) em "Molecular markers, natural history and evolution"

"Ando devagar porque já tive pressa Levo esse sorriso porque já chorei demais Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe Só levo a certeza de que muito pouco eu sei Eu nada sei..."

> Almir Sater em "Tocando em frente"

Agradecimentos

São muitas as pessoas a quem devo agradecer e espero não esquecer ninguém... E agora, pensando em como fazer isso, chego à conclusão que as palavras não são suficientes para expressar toda minha gratidão...

• Maria José de Jesus Silva, um exemplo de força, determinação, retidão, ética, dedicação ao trabalho e à família. Por ter aceito me acompanhar nesta jornada, pela orientação e dedicação ao desenvolvimento deste trabalho, pelo tempo e paciência a mim destinados. Por não desistir de mim nem mesmo nos momentos mais difíceis, pela sincera e verdadeira amizade com a qual pude contar durante todos estes anos.

• Vinícius Xavier da Silva, por compartilhar a paixão pelo grupo *neuwiedi* e mostrar um caminho, pela co-orientação em todas as etapas, pela identificação dos espécimes deste trabalho, pela amizade e palavras que chegaram na hora certa.

• Otávio Marques, Ricardo Sawaya, Hebert Ferrarezzi, Francisco Franco, Paulo Passos, Dr. Juan Carlos Chaparro-Auza,. Kátia Pellegrino pela ajuda no meio herpetológico para a busca incessante por amostras de tecidos.

• Pelas amostras de tecidos cedidas, essenciais para o desenvolvimento deste trabalho:

- Instituto Butantan, vinculado à Coleção Herpetológica "Alphonse Richard Hoge", Dr. Francisco Franco e Valdir José Germano.

- Departamento de Zoologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IBUSP), Dr. Miguel T. Rodrigues, Felipe Franco, Dante Pavan e José Cassimiro.

- Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, Dr. Hussam Zaher e Carolina Castro-Mello.

- Coleção Herpetológica da Universidade Nacional de Brasília, Dr. Guarino Colli, Fabrícius Maia, Cristiano Nogueira, Marcela Ayub Brasil e Mariana Caixeta Viana.

- Coleção Herpetológica do Instituto de Ciências Exatas e Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, Profa. Dra. Maria Rita Silvério Pires.

- Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, Dr. Wilson Fernandes e Sávio Santana.

- Núcleo de Ofiologia de Porto Alegre da Fundação Parque Zoobotânico do Rio Grande do Sul, Maria Lucia Machado Alves, Moema Leitão Araujo, Flavio Carlucci, Clara Liberato, Nathalia Rocha Matias e Tyelli dos Santos Ramos.

- Centro de Estudos e Pesquisas Biológicas da Universidade Católica de Goiás, Marta Magalhães.

- Núcleo de Ofiologia Regional do Mato Grosso da Universidade Federal do Mato Grosso, Dra. Christine Strüssmann e Dra. Tami Mott.

- Serpentário da Universidade Federal da Bahia, Rejâne Lira e Breno Hamdan.

- Laboratório de Animais Peçonhentos e Toxinas da Universidade Federal de Pernambuco, Dra. Mirian Camargo Guarnieri e Érika Nunes.

- Serpentário da Universidade de Passo Fundo, Noeli Zanella e Simone Nunes.

- Centro de Biologia Genômica e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Felipe Grazziotin.

- Museo Nacional de Ciencias Naturales (Espanha), Dr. Ignacio De la Riva, Isabel Rey e Beatriz Alvarez Dorda.

- Dr. Vinícius Xavier Silva da Universidade Federal de Alfenas.

- Paula Hana Valdujo, doutoranda do Departamento de Ecologia do IBUSP. -Henrique Caldeira, mestrando da Universidade Federal de Viçosa.

• Roberto do Val Vilella pela iniciação nos métodos de análise filogenética.

• Silvia Geurgas pela ajuda antes que tudo começasse, com "genepop", e pela assessoria em diversos assuntos moleculares.

• Hebert Ferrarezzi pelo entusiasmo, ajuda com os assuntos herpetológicos, análises do TNT e leitura deste trabalho.

• José Salvatore Patané, pela paciência e incentivo, conhecimento compartilhado, ajuda com as análises filogenéticas e leitura deste trabalho.

• Nancy Oguiura pela ajuda com as coisas de ordem prática no laboratório, otimismo, incentivo, atitude zen e leitura deste trabalho.

• Fausto Errito Barbo pela ajuda com o Diva -Gis.

• Dário Siqueira pela boa vontade, paciência e super ajuda com a edição dos mapas.

• Willi Hennig Society pela disponibilização do programa TNT.

• Instituto Butantan pela infraestrutura.

• Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular, que começou no Laboratório de Genética e migrou para o Laboratório de Ecologia e Evolução (LEEV). Aos companheiros de laboratório de todos os tempos: Luciana, Camilla, Ana Paula, Adelita, Keila, José, Fernanda, Yuri, Poli, Rafael, Nancy e Maria por sempre tornarem este ambiente um lugar maravilhoso para se trabalhar, pela cooperação, bom humor, amizade, apoio e momentos de descontração. Desculpem-me por ser um agente dispersor e pela emotividade demasiada dos últimos tempos.

• Pesquisadores e alunos do LEEV por ter nos acolhido com tanto carinho, partilhando seus conhecimentos e espaços. Aos funcionários pelo suporte logístico. A todos, por todas as conversas, almoços, risadas e festas que tornaram esta jornada mais leve. Em especial ao carinho de Thaís Guedes, Letícia Sueiro e Selma Almeida-Santos.

• Funcionários, pesquisadores e alunos do Laboratório de Herpetologia, em especial ao Valdir José Germano que auxiliaram durante o projeto, coletando tecidos, separando exemplares de serpentes, e o mais importante manipulando-as com todo cuidado e respeito.

• Pesquisadores e funcionários do Centro de Biotecnologia, pelo uso do sequenciador. Especialmente ao Leonardo Kobashi, técnico responsável pelo sequenciamento, sempre disposto a ajudar.

• Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, por ter me acolhido durante a graduação e o mestrado.

• Dra. Yatiyo Yassuda e seus alunos por terem me recebido em seu laboratório durante todos estes anos, pelo suporte e ensinamentos.

• Dr. Miguel Rodrigues pelo apoio a este projeto, disponibilizando a infraestrutura de seu laboratório.

• Deisy, Helenice, Genuveva, Érica, Helder, Vera, Eduardo, pela boa vontade, prestatividade e toda ajuda com a parte administrativa!!!!!!!!!!

 Professora Regina Célia Mingroni Netto pelo apoio, e momentos compartilhados no estágio PAE.

• Professores e colegas de pós-graduação pelos conhecimentos e momentos compartilhados.

• CAPES, pela bolsa concedida e apoio financeiro PROAP.

• FAPESP, pelos recursos financeiros para a montagem do laboratório e desenvolvimento da pesquisa.

• Aos amigos que me incentivaram e apoiaram, acreditando que eu seria capaz de concluir esta jornada. Por compreenderem a minha ausência e ao mesmo tempo me lembrarem do verdadeiro motivo de tudo isso:

- Yukie e Eduardo Kuwabara, Viviane Dias, Renata Cecília, Carolina Elena e Gabriela, Maria e Vini, Kátia Pepê, Raquel Penna, Marcinha, Lincoln, Adriana, Sophia e Vítor, Maíra, Sabrina, Fábio Raposo, Ruth Vassão.

- Fernanda, Lúcio, Sofia e Bento da família Feitosa; Marlene, Dirceu e Gustavo da família Sousa.

- Ângela Tikkanen, Ronaldo Negrão, Bete, Mislene, Maria Fernanda, Márcia, Silvia, Ana, Dona Anita, Carmo.

- Danielle Almeida, Tatiana Strelec, Juliana Caulkins, Cristiane Ottoni, Giselle e Antônio.

- Luciana e José de Moraes, Marcos Muniz, Tia Neuza, Jurema, Bia.

- Meus alunos, por me ensinarem a ser mais paciente e tolerante comigo mesma.

- À minha família maravilhosa, meu alicerce: Jeanete, Sônia, Ricardo Yaralice, Patrícia, Dário e Ivan que têm me amado, apoiado e incentivado por todos estes anos, por tudo o que já fizeram por mim...

ÍNDICE

1. Introdução					
1.1. Ordem Squamata					
1.2. Família Viperidae, Subfamília Crotalinae					
1.3. Gênero Bothrops sensu stricto	04				
1.4. Grupo <i>Bothrops neuwiedi</i>	07				
1.5. Complexo Bothrops neuwiedi	09				
1.6. Abordagens moleculares: considerações sobre inferências					
filogenéticas baseadas em sequências de DNA	13				
1.7. O DNA mitocondrial em serpentes	14				
2. Objetivos	29				
3. Material e Métodos	29				
3.1. Material	29				
3.2. Métodos	40				
3.2.1. Obtenção de tecidos para a extração de DNA	40				
3.2.2. Obtenção de sequências dos genes mitocondriais	41				
3.3. Análise das sequências	45				
3.4. Análise dos dados	46				
4. Resultados	50				
4.1. Reconstruções filogenéticas	52				
4.2. Distância genética	56				
5. Discussão	61				
6. Conclusões					
7. Resumo	85				
8. Abstract					
9. Referências Bibliográficas					

1. INTRODUÇÃO

1.1. Ordem Squamata

A Ordem Squamata, grupo monofilético formado por lagartos, serpentes e anfisbenas, é composta por aproximadamente 8430 espécies viventes, representando o maior componente da diversidade de vertebrados terrestres do mundo (Tabela 1). Deste total, a Subordem Serpentes destaca-se com cerca de 3150 espécies, distribuídas em 24 famílias (Hedges & Vidal, 2009; Uetz, 2009; Oguiura *et al.*, 2010).

As serpentes são animais de corpos extremamente alongados, com ausência de apêndices locomotores, pálpebras móveis e ouvido externo (Underwood, 1967; Ferrarezzi, 1994). A redução ou perda de patas, apesar de ser uma característica marcante entre as serpentes, ocorreu independentemente em outras linhagens da Ordem Squamata, como nos dibamídeos e anfisbenas (Apesteguía, 2007). A produção de veneno, outra característica marcante, atribuída às serpentes, é compartilhada pelos lagartos das famílias Helodermatidae, Anguidae, Varanidae e Iguania (Fry *et al.*, 2005).

A Subordem Serpentes está dividida em dois grupos principais: Infraordem Scolecophidia, composta por serpentes de pequeno porte, cegas e fossoriais, e Infraordem Alethinophidia, composta pelas demais serpentes (McDowell, 1987; Rieppel, 1988) (Tabela 1, Figura 1).

A Infraordem Alethiophidia é subdividida nas Parvordens Amerophidia, Henophidia e Caenophidia (Oguiura et al., 2010). Amerophidia é constituída pelas famílias Aniliidae e Tropidophiidae, e foi proposta pela abordagem molecular desenvolvida por Vidal et al. (2007). Henophidia indicado como parafilético em todas as análises morfológicas, tem sido resgatado como grupo monofilético recorrente nas analises moleculares, pelo menos para as famílias Cylindrophiidae, Uropeltidae, Xenopeltidae, Loxocemidae, Pythonidae, Calabaridae e Boidae, cujos membros mais conhecidos são as jibóias, sucuris e pítons (Vidal & Hedges, 2004; Oguiura et al., 2010). Caenophidia reúne todas as serpentes venenosas e compreende as famílias Acrochordidae. Xenodermatidae, Pareatidae. Homalopsidae, Lamprophiidae, Natricidae, Pseudoxenodontidae, Dipsadidae, Colubridae, Elapidae e Viperidae (Vidal & Hedges, 2004; Oguiura et al., 2010). Este grupo possui muitos representantes conhecidos em função da importância médica, como as serpentes marinhas, corais verdadeiras, najas, cascavéis e jararacas.

1.2. Família Viperidae, Subfamília Crotalinae

Neste trabalho, dentro de Caenophidia, será destacada a família Viperidae, e, mais especificamente, o gênero *Bothrops* da subfamília Crotalinae (Tabela 1).

Os representantes da família Viperidae possuem o mecanismo mais sofisticado para injeção de veneno conhecido entre as serpentes. O maxilar, extremamente reduzido, possui alta mobilidade e um par de grandes presas tubulares retráteis, similares a agulhas hipodérmicas (Pough & Grooves, 1983; Greene, 1992). Este aparato relacionado ao hábito predatório, baseado em botes de presas relativamente grandes, é responsável pela relevância médica do grupo, envolvido na maioria dos casos de acidentes ofídicos (Warrel, 2004).

Os viperídeos compreendem cerca de 270 espécies, com ampla distribuição em todos os continentes, exceto Austrália e Antártida (Ferrarezzi, 1994; Terribile *et al.*, 2009) (Figura 2).

Com base em dados morfológicos, a família Viperidae era dividida em quatro subfamílias: Azemiopinae e Causinae, consideradas basais dentro da família, e Viperinae e Crotalinae, como derivadas (McDiarmid *et al.*, 1999).

Wüster *et al.* (2008), baseados em análises filogenéticas a partir de sequências de genes mitocondriais, propuseram a divisão de Viperidae em três subfamílias: (i) Azemiopinae distribuída no sudeste da Ásia, com um único representante: *Azemiops feae*; (ii) Viperinae na Eurásia e África; e (iii) Crotalinae no Novo Mundo, sul da Ásia e leste da Europa (Figura 3). Nestas análises, os autores recuperaram *Azemiops* como grupo irmão de Crotalinae; Viperinae como grupo irmão de *Azemiops* e Crotalinae; e o gênero *Causus*, posicionado como um viperídeo basal em abordagens morfológicas, foi recuperado como um grupo interno da subfamília Viperinae, resultando na supressão da subfamília Causinae (Figura 3).

A subfamília Crotalinae é considerada monofilética, apresentando como sinapomorfia a presença de fosseta loreal com epitélio termo-sensorial extremamente sensível, capaz de detectar mudanças de milésimos de graus centígrados no ambiente (Cadle, 1987; Apesteguía, 2007; Wüster *et al.*, 2008; Castoe *et al.*, 2009). Seus representantes são conhecidos como víboras de fosseta – *pitvipers* (Ferrarezzi, 1994; Campbell & Lamar, 2004).

Tem sido registrados 28 gêneros de crotalíneos distribuídos pelo mundo, dos quais apenas 12 ocorrem no continente americano: *Agkistrodon*, *Atropoides*,

Bothriechis, Bothriopsis, Bothrocophias, Bothrops, Cerrophidion, Crotalus, Lachesis, Ophryacus, Porthidium e Sistrurus (Campbell & Lamar, 2004; Uetz, 2009).

As relações de parentesco na Subfamília Crotalinae foram estudadas por Wüster *et al.* (2008) e Castoe *et al.* (2009), a partir de inferências bayesianas, utilizando sequências dos genes mitocondriais citocromo *b* (cyt *b*), NADH desidrogenase subunidade 4 (ND4), RNA ribossomal subunidade 12 (12S) e subunidade 16 (16S), ambos os estudos recuperam topologias muito semelhantes. As discordâncias detectadas referem-se à posição do gênero *Bothriechis* em relação aos demais gêneros e ao *status* de *Bothriopsis* (Figura 4). O gênero *Bothriechis* foi recuperado como grupo irmão de (*Atropoides (Porthidium, Cerrophidion*)) nas análises de Wüster *et al.* (2008), e como grupo irmão do clado mais inclusivo formado por (((*Atropoides (Porthidium, Cerrophidion*))(*Bothrocophias (Bothrops, Bothriopsis*))) no trabalho de Castoe *et al.* (2009). No entanto, em função dos baixos suportes observados em ambas as análises, a posição de *Bothriechis* permanece não resolvida.

O status de Bothriopsis tem sido controverso desde as primeiras análises moleculares, realizadas na década de 1990. Os resultados obtidos por Werman (1992) foram os primeiros a indicar que o gênero Bothrops seria parafilético, uma vez que suas análises posicionaram Bothriopsis taeniata (espécie-tipo de Bothriopsis) entre as espécies de Bothrops. O monofiletismo de Bothriopsis e o parafiletismo de Bothrops foram corroborados por diversas análises posteriores (Salomão et al., 1997, 1999; Parkinson, 1999; Gutberlet & Campbell, 2001; Wüster et al., 2002a; Castoe & Parkinson, 2006; Fenwick et al., 2009). Diante deste panorama, duas possibilidades foram sugeridas: a sinonimização de Bothriopsis ao gênero Bothrops (Salomão et al., 1997; Wüster et al., 2002a, 2008) ou a reorganização de Bothrops em outros gêneros, com a manutenção de Bothriopsis (Parkinson, 1999; Gutberlet & Campbell, 2001; Castoe et al., 2009; Fenwick et al., 2009).

1.3. Gênero Bothrops sensu stricto

A etimologia da palavra *Bothrops* provém do grego "bothros", que significa fosseta, e "ops", que significa olho ou face, em alusão à fosseta loreal, localizada entre a narina e o olho destas serpentes (Campbell & Lamar, 2004).

O gênero *Bothrops* apresenta ampla distribuição, sendo os extremos representados no sul do México por *B. asper* e por *B. ammodytoides* na Patagônia, Argentina. Quatro espécies são exclusivamente insulares: *B. caribbaeus* (Santa Lúcia) e *B. lanceolatus* (Martinica) das Pequenas Antilhas; *B. insularis* (Queimada Grande) e *B. alcatraz* (Alcatrazes) do litoral do Estado de São Paulo, Brasil (Campbell & Lamar, 2004).

Investigações sobre a origem e evolução das serpentes peçonhentas da América do Sul sugerem que as diversidades morfológica e ecológica, características do gênero *Bothrops*, podem ser resultado de uma colonização do continente desprovido de viperídeos, seguida de uma rápida radiação adaptativa durante o Mioceno (10-23 Ma) (Wüster *et al.*, 2002a).

Os representantes do gênero mostram uma grande diversidade de tamanho, variando entre 30cm (*B. itapetiningae*) e 180cm (*B. asper*) (Campbell & Lamar, 2004). Ecologicamente são muito diversos e podem apresentar hábito terrícola ou semi-arborícola, sendo o primeiro predominante entre as espécies do grupo. Em geral, as espécies semi-arborícolas apresentam corpo menos robusto e cauda mais alongada do que as terrícolas. Estudos da evolução destas características ecológicas indicam que o hábito semi-arborícola está relacionado a espécies que habitam regiões de floresta e teria surgido de uma a três vezes no gênero (Martins *et al.*, 2001). Os autores sugerem a hipótese de que o ancestral do gênero teria tamanho pequeno, corpo robusto e hábito terrícola.

Quanto ao hábito alimentar, a maioria das espécies do gênero é generalista, com variação ontogenética, de modo que os exemplares juvenis alimentam-se preferencialmente de presas ectotérmicas (centípedes, lagartos e anfíbios) e os adultos, de presas endotérmicas (roedores e aves). As exceções são *B. cotiara, B. alternatus, B. fonsecai* e *B. neuwiedi* que se alimentam exclusivamente de roedores (Martins *et al.*, 2002).

Outra evidência da diversidade neste gênero é a ampla variação na composição e atividade dos venenos, que pode ter implicações no tipo de tratamento do envenenamento, na produção de soro, em estudos evolutivos das

toxinas e na taxonomia (Rodrigues *et al.*, 1998; Queiroz *et al.*, 2008; Leme *et al.*, 2009). Tais aspectos ganham ainda mais importância à medida que os acidentes botrópicos correspondem a mais de 75% dos acidentes ofídicos no Brasil, segundo estatísticas do Sistema de Informação de Notificação de Agravos (SINAN) (Ministério da Saúde, 2010).

O veneno das serpentes é uma mistura complexa de componentes, que pode exibir variações associadas à origem geográfica, hábitat, variação sazonal, dieta, idade e gênero. Exemplo disso ocorre nas fêmeas de *B. jararaca,* que produzem cinco vezes mais veneno do que os machos (Furtado *et al.*, 2006). Queiroz *et al.* (2008), em estudo sobre a variação interespecífica na composição e toxicidade do veneno de 19 espécies do gênero *Bothrops,* relatam ampla diversidade. Segundo os autores, o soro antibotrópico brasileiro é resultante da mistura de venenos de apenas cinco espécies. Portanto, este soro não é capaz de neutralizar as atividades tóxicas de todos os venenos encontrados na natureza. Por este motivo, os autores sugerem a necessidade de inclusão de venenos de outras espécies na preparação do soro antibotrópico universal.

Apesar de toda a diversidade do grupo, sua importância ecológica, relevância médica decorrente dos acidentes ofídicos e da utilidade de componentes dos venenos na produção de fármacos, a sistemática do gênero *Bothrops* permanece com vários problemas devido à falta de conhecimento sobre quais espécies são válidas, o seu número e suas relações de parentesco.

Várias abordagens foram realizadas na tentativa de esclarecer as relações filogenéticas dentro do gênero. Foram utilizados caracteres morfométricos, merísticos (contagem de escamas), coloração, ornamentação, morfologia do hemipênis, osteologia, eletroforese do plasma, alozimas, citogenética e, mais recentemente, enfoques moleculares provenientes de sequenciamento de genes do DNA mitocondrial e nuclear em alguns grupos (Beçak, 1967; Beçak & Beçak, 1969; Singh, 1972; Fernandes & Pesantes, 1989; Pesantes, 1989; Pesantes & Fernandes, 1989; Fernandes *et al.*, 1991; Fernandes & Abe, 1991; Cadle, 1992; Werman, 1992; Pesantes *et al.*, 1993; Salomão *et al.*, 1997, 1999; Parkinson, 1999; Gutberlet & Campbell, 2001; Wüster *et al.*, 2002a, 2002b, 2008; Castoe & Parkinson, 2006; Fenwick *et al.*, 2009).

Estudos citogenéticos no gênero *Bothrops* não se mostraram informativos do ponto de vista citotaxonômico, pois há preponderância de cariótipos conservados

com 2n=36, compostos por oito pares de macrocromossomos e 10 pares de microcromossomos. O mecanismo de determinação de sexo é do tipo ZZ/ZW, sendo as fêmeas heterogaméticas. Esses dados foram detectados em *B. alternatus*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* (*B. atrox*) e *B. insularis* (Beçak, 1967; Beçak & Beçak, 1969; Singh, 1972).

Durante algum tempo, a síntese de diversos trabalhos com enfoques filogenéticos baseados em diferentes caracteres (*e.g.* morfológicos, bioquímicos e moleculares) permitiu definir oito grupos dentro de *Bothrops* (*sensu stricto*): 1. **grupo** *alternatus* (*B. alternatus*, *B. ammodytoides*, *B. cotiara*, *B. fonsecai* e *B. itapetiningae*); 2. **grupo** *atrox* (*B. atrox*, *B. colombiensis*, *B. isabelae*, *B. leucurus*, *B. marajoensis*, *B. moojeni* e *B. pradoi*); 3. **grupo** *jararaca* (*B. jararaca*, *B. insularis* e *B. alcatraz*); 4. **grupo** *jararacussu* (*B. jararacussu* e *B. brazili*); 5. **grupo** *lanceolatus* (*B. lanceolatus* e *B. caribbaeus*); 6. **grupo** *neuwiedi* (*B. neuwiedi*, *B. andianus*, *B. erythromelas* e *B. iglesiasi*); 7. **grupo** *pictus* (*B. pictus*); e 8. **grupo** *taeniatus* (*B. taeniatus* e *B. bilineatus*) (Janeiro-Cinquini *et al.*, 1987; Pesantes, 1989; Pesantes & Fernandes, 1989; Fernandes & Pesantes, 1989; Fernandes *et al.*, 1991; Cadle, 1992; Werman, 1992; Pesantes *et al.*, 1993; Salomão *et al.*, 1997, 1999; Wüster *et al.*, 1997, 1999, 2002a; Parkinson *et al.*, 2002).

Fenwick et al. (2009) propuseram uma nova classificação para o gênero Bothrops, utilizando uma análise combinada de caracteres morfológicos e moleculares de 32 espécies de Bothrops, seis de Bothriopsis e cinco de Bothrocophias. Cada uma das guatro principais linhagens monofiléticas recuperadas foi considerada como um gênero: Rhinocerophis, Bothriopsis, Bothropoides e Bothrops. Desta forma, o gênero Bothrops ficaria restrito às espécies do grupo atrox (B. atrox, B. colombiensis, B. isabelae, B. leucurus, B. marajoensis, B. moojeni, B. asper, B. venezuelensis, B. osbornei, B. punctatus), do grupo jararacussu (B. jararacussu, B. brazili, B. pirajai, B. muriciensis e B. santaecrucis), do grupo lanceolatus (B. lanceolatus e B. caribbaeus) e por B. andianus; o gênero *Rhinocerophis* seria composto pelas espécies do grupo alternatus (B. alternatus, B. ammodytoides, B. cotiara, B. fonsecai, B. itapetiningae e B. jonathani); o gênero Bothropoides, constituído pelas as espécies do grupo jararaca (B. jararaca, B. insularis e B. alcatraz) e neuwiedi (B. neuwiedi, B. lutzi, B. pauloensis, B. pubescens, B. diporus, B. mattogrossensis, B. marmoratus, B. erythromelas); e o gênero Bothriopsis, considerado por alguns autores como grupo taeniatus (B.

taeniatus, B. bilineatus, B. medusa, B. oligolepis, B. pulcher e B. peruvianus) (Fenwick et al., 2009).

O presente trabalho tem como interesse principal o grupo *neuwiedi*. Optou-se pela utilização da nomenclatura prévia a Fenwick *et al.* (2009), uma vez que a filogenia apresentada por esses autores não inclui todas as espécies de *Bothrops*. Adicionalmente, para algumas das espécies, os dados apresentados foram insuficientes para o esclarecimento das relações de parentesco. A inclusão de novos e imprescindíveis dados nas análises poderia alterar as relações dentro e entre os grupos monofiléticos propostos pelos autores. Como essa proposta está em construção, para evitar problemas inerentes à mudança de nomes de espécies de importância médica, foi mantida a nomenclatura tradicional para o grupo.

1.4. Grupo^{*} *Bothrops neuwiedi*

O agrupamento de espécies denominado grupo *neuwiedi*, foi proposto inicialmente por Burger (1971), com base em dados morfológicos. Segundo o autor, *B. neuwiedi* seria relacionada à *B. itapetiningae* e *B. iglesiasi*. Werman (1992), por meio de análises morfológicas e de alozimas, recuperou o grupo *neuwiedi* contendo as espécies com escama lacunolabial dividida (*B. alternatus, B. erythromelas, B. itapetiningae* e *B. neuwiedi*). Pesantes-Segura *et al.* (*apud* Campbell & Lamar, 2004) sugeriram, de acordo com análises fenéticas de características do hemipênis, que o grupo *neuwiedi* fosse formado por *B. andianus, B. erythromelas, B. iglesiasi* e *B. neuwiedi*.

As primeiras análises filogenéticas baseadas em dados moleculares de sequências do gene mitocondrial para o citocromo *b* incluíram apenas *B. erythromelas* (Kraus *et al.*, 1996; Parkinson, 1999), não sendo possível a investigação das relações propostas anteriormente.

Após revisão taxonômica de Silva (2000, 2004) e Silva & Rodrigues (2008), além de *B. neuwiedi*, seis espécies foram incorporadas ao grupo *neuwiedi*: B.

^{*} A terminologia "grupo", como empregada até este ponto, tem conotação geral e refere-se a um grande agrupamento do ponto de vista filogenético (ou monofilético), contendo várias espécies mais aparentadas entre si, em relação às demais. O termo "complexo" tem caráter mais restrito e refere-se a um agrupamento do ponto de vista taxonômico, no qual uma espécie formal, com grande variação, pode, após uma revisão taxonômica, ser confirmada como uma espécie com ampla variação individual ou pode ser dividida em várias espécies plenas. As definições se confundem à medida que, após revisão taxonômica realizada por Silva (2000, 2004) e Silva & Rodrigues (2008), algumas espécies novas agora reconhecidas passam a fazer parte do grupo. A primeira abordagem compreenderá *Bothrops neuwiedi* como grupo, e posteriormente (item 1.5), será elucidado o histórico do complexo.

diporus, B. lutzi, B. mattogrossensis, B. pauloensis, B. pubescens e B. marmoratus. B. iglesiasi foi sinonimizada a B. lutzi.

As análises filogenéticas baseadas em dados moleculares que sucederam à revisão taxonômica do grupo incluíram *B. neuwiedi*, *B. erythromelas*, *B. itapetiningae* e *B. alternatus*, possibilitando o teste das hipóteses propostas por Burger (1971) e Werman (1992).

As análises de Wüster *et al.* (2002a), baseadas em sequências dos genes mitocondriais cyt *b* e ND4, recuperaram *B. neuwiedi* como grupo irmão de *B. erythromelas;* e *B. itapetiningae* como grupo irmão de *B. alternatus*, porém as relações entre estas espécies não foram recuperadas conforme sugeridas pela abordagem morfológica. Castoe & Parkinson (2006), adicionando às análises de Wüster *et al.* (2002a) dados dos genes 12S e 16S, obtiveram resultados semelhantes, utilizando *B. diporus, B. erythromelas* e *B. alternatus.* Ambas as análises recuperaram *jararaca* como grupo irmão do grupo *neuwiedi.*

Fenwick *et al.* (2009) realizaram a análise mais completa para o grupo *neuwiedi*, incluindo dados moleculares e morfológicos de *B. diporus, B. erythromelas, B. neuwiedi* e *B. pauloensis.* Foram utilizados caracteres exclusivamente morfológicos de *B. mattogrossensis* e *B. andianus.* Não foram incluídas as espécies *B. lutzi, B. pubescens* e *B. marmoratus* na análise (Figura 5). Pela primeira vez, a hipótese de *B. andianus* pertencer ao grupo *neuwiedi* pode ser testada. A espécie foi recuperada em locais alternativos - ora como grupo irmão do clado *Bothrops* + *Bothriopsis,* com a exclusão de *B. pictus* e *B. venezuelensis,* ora como grupo irmão de *Bothrocophias myersi* dentro do clado *Bothrops* + *Bothriopsis* (Figura 5). Os autores sugeriram que a espécie fosse alocada no grupo *atrox,* com base na ausência de escama dorsais tuberculadas, que caracteriza *Bothrocophias,* e na presença de escama lacunolabial compartilhada com *Bothrops atrox.*

Na análise que excluiu os táxons com dados exclusivamente morfológicos, o monofiletismo do grupo *neuwiedi* foi recuperado (*B. erythromelas* (*B. neuwiedi* (*B. pauloensis*, *B. diporus*))), sendo *jararaca* o grupo irmão. No entanto, na análise que incluiu também os táxons com dados exclusivamente morfológicos, *B. mattogrossensis* apareceu relacionada à *B. alternatus*, e *B. sanctaecrucis* foi grupo irmão do restante do grupo *neuwiedi*. Baseando-se na descrição morfológica original proposta por Silva (2000, 2004) e Silva & Rodrigues (2008), os autores alocaram *B. mattogrossensis* no grupo *neuwiedi*.

As relações de *B. itapetiningae*, *B. alternatus* e *B. andianus* com o grupo *neuwiedi* não foram recuperadas nas análises realizadas, sugerindo que a composição do grupo fosse restrita a oito espécies: *B. erythromelas, B. neuwiedi, B. diporus, B. lutzi, B. mattogrossensis, B. pauloensis, B. pubescens* e *B. marmoratus* (Silva, 2000, 2004; Wüster *et al.*, 2002a; Castoe & Parkinson, 2006; Silva & Rodrigues, 2008; Fenwick *et al.*, 2009).

Os estudos realizados, sejam com dados morfológicos ou moleculares, demonstram que a compreensão das relações filogenéticas das espécies do grupo *neuwiedi* está apenas começando, reforçando a necessidade de que mais estudos, partindo de dados moleculares, bioquímicos, osteológicos, anatômicos e ecológicos, sejam desenvolvidos, como indicam trabalhos recentes com abordagem multidisciplinar (Wüster *et al.*, 2005a; Sanders *et al.*, 2006; Fenwick *et al.*, 2009).

1.5. Complexo Bothrops neuwiedi

A história do complexo *Bothrops neuwiedi* iniciou-se no ano de 1824, com a descrição de um espécime coletado no Estado da Bahia por Wagler, naturalista alemão. A serpente foi coletada durante a viagem de Johann Baptist Ritter von Spix e Carl Friedrich Philip von Martius pelo Brasil. O exemplar foi denominado *Bothrops neuwiedi* em homenagem ao príncipe Maximilianus Wied-Neuwiedi, um dos primeiros naturalistas a realizar uma viagem exploratória da fauna e flora brasileiras, durante o período do reinado de Dom João VI no Brasil.

Decorrido um século, nove subespécies foram descritas por Amaral (1925), com base na variação da coloração, padrão de manchas do corpo e da cabeça, e ocorrência geográfica: *B. n. neuwiedi, B. n. bahiensis, B. n. minasensis, B. n. goyazensis, B. n. mattogrossensis, B. n. paranaensis, B. n. pauloensis, B. n. piauhyensis, B. n. riograndensis.* Três subespécies foram descritas posteriormente: *B. n. boliviana* (Amaral, 1927), *B. n. meridionalis* (Amaral, 1930) e *B. n. fluminensis* (Amaral, 1933).

A taxonomia do grupo passou por considerável reformulação envolvendo a sinonimização de vários táxons: *B. n. bahiensis*, sinônimo júnior de *Lachesis lutzi* (Miranda-Ribeiro, 1915) passou a ser denominada *B. n. lutzi* (Amaral, 1930; Hoge, 1966); *B. n. minasensis*, sinônimo júnior de *Bothrops urutu* (Lacerda, 1884) foi chamada *B. n. urutu* (Amaral, 1937; Hoge, 1966); *B. n. riograndensis*, sinônimo júnior de *Trigonocephalus pubescens* (Cope, 1870) passou a ser denominada *B. n.*

pubescens (Hoge, 1959, 1966); *B. n. meridionalis*, sinônimo júnior de *Bothrops diporus* (Cope, 1862) passou a ser chamada *B. n. diporus* (Cochran, 1961; Hoge, 1966); *B. n. fluminensis*, sinônimo júnior de *Bothrops atrox meridionalis* (Cope, 1885) foi denominada *B. n. meridionalis* (Hoge, 1966), e *B. n. boliviana* teve o nome corrigido para *B. n. bolivianus* (Hoge, 1966).

Dessa forma, *B. neuwiedi* passou a ser considerado um complexo taxonômico composto por 12 subespécies: *B. n. neuwiedi, B. n. bolivianus, B. n. diporus, B. n. goyazensis, B. n. lutzi, B. n. mattogrossensis, B. n. meridionalis, B. n. paranaensis, B. n. pauloensis, B. n. piauhyensis, B. n. pubescens e B. n. urutu, com ampla distribuição pelas áreas abertas da América do Sul, ocorrendo no Brasil, Peru, Bolívia, Paraguai, Argentina e Uruguai. Aparentemente nenhuma subespécie deste complexo ocorria na Caatinga, domínio de <i>B. erythromelas,* e havia registros de uma população de *B. n. mattogrossensis* isolada nos enclaves de Cerrado em Humaitá, no Estado do Amazonas (Peters & Orejas-Miranda, 1970; Hoge & Romano-Hoge, 1980; Vanzolini *et al.*, 1980; Campbell & Lamar, 1989; Silva, 2000).

A revisão taxonômica do complexo *neuwiedi* foi realizada por Silva (2000), cujas principais conclusões foram publicadas em Silva (2004) e Silva & Rodrigues (2008). Foram analisados seis caracteres morfométricos, 22 merísticos e caracteres qualitativos (padrão dos desenhos, coloração de fundo e das manchas) para uma amostra de 1759 exemplares de 360 localidades da América do Sul. Muitos caracteres analisados tiveram grande variação em termos individual, sexual e geográfico. Os caracteres de folidose (contagem de escamas) apresentaram ampla sobreposição. Entre todas as características avaliadas, apenas a morfologia dos hemipênis mostrou-se conservada.

A grande variação e sobreposição observadas impossibilitaram a utilização de vários caracteres quantitativos, de modo que, com base em caracteres predominantemente qualitativos, foram identificados sete padrões, que permitiram a elevação de seis subespécies à categoria de espécies plenas, sendo seis sinonimizadas e uma espécie nova reconhecida (Figuras 6 a 12, Tabela 2): *B. neuwiedi* (sinônimos: *B. neuwiedi goyazensis, B. neuwiedi paranaensis, B. neuwiedi meridionalis e B. neuwiedi urutu*); *B. diporus; B. lutzi* (sinônimos: *B. neuwiedi piauhyensis, B. iglesiasi*); *B. mattogrossensis* (sinônimo: *B. neuwiedi bolivianus*); *B. pauloensis*; *B. pubescens* e *B. marmoratus* (Silva, 2000, 2004; Silva & Rodrigues, 2008).

A análise de distribuição das espécies mostrou predominância do grupo em paisagens abertas, nos domínios morfoclimáticos do Chaco, Cerrado e Caatinga, chamados de grande diagonal das formações abertas da América do Sul. Foi observada ampla sobreposição das distribuições geográficas das diferentes espécies, porém poucas ocorrências de simpatria - apenas 25 localidades das 360 amostradas. Em 23 localidades, foi registrada a ocorrência de duas espécies, e em duas localidades, Brasília (DF) e Campinorte (GO) foi registrada a ocorrência de três espécies (Figura 13, Tabela 3). No entanto, segundo Silva (2000) não é possível dizer com segurança se as espécies são sintópicas.

B. diporus, B. lutzi, B. mattogrossensis, B. neuwiedi e B. pauloensis apresentaram-se distribuídas amplamente por diferentes ambientes, enquanto *B. pubescens* e *B. marmoratus* mostraram distribuições restritas a ambientes ecologicamente mais homogêneos. Três espécies exibiram estreita relação com o domínio dos Cerrados: *B. lutzi, B. pauloensis* e *B. marmoratus*, sendo a última detectada exclusivamente neste hábitat. Duas espécies foram associadas ao domínio do Chaco, mas não exclusivamente: *B. diporus* e *B. mattogrossensis. Bothrops neuwiedi* foi registrada em áreas montanhosas ao longo da costa leste do Brasil, principalmente em regiões com altitudes superiores a 1000 m, e *B. pubescens* foi predominante nas Coxilhas do Rio Grande do Sul e Uruguai (Silva, 2000, 2004; Silva & Rodrigues, 2008) (Figuras 6 a 12).

De acordo com Silva (2000), foi possível separar as espécies em dois grupos, conforme o padrão de coloração: um com manchas dorsais de bordas bem marcadas e presença de manchas intercalares entre as manchas principais, representado por *B. neuwiedi, B. diporus, B. mattogrossensis* e *B. pubescens*, e o outro, com manchas dorsais de bordas difusas e manchas intercalares ausentes ou pouco nítidas, composto por *B. lutzi, B. marmoratus* e *B. pauloensis* (Tabela 2, Figuras 6 a 12). Esta dicotomia foi recuperada nas análises de distância e parcimônia realizadas pelo autor. Na análise de parcimônia (Figura 14), utilizando *B. erythromelas* como grupo externo, foram recuperados três grupos monofiléticos: o primeiro clado recuperou a relação (*B. neuwiedi* + *B. pubescens*), grupo irmão do segundo clado (*B. diporus* + *B. mattogrossensis*); e o terceiro clado recuperou *B. marmoratus, B. lutzi* e *B. pauloensis*, cujas relações internas não foram resolvidas, como grupo irmão dos demais.

11

Silva (2000) propôs que a proximidade filogenética de *B. diporus e B. mattogrossensis,* sustentada pelas sinapomorfias do tipo de ornamentação das supralabiais e sua extensão, aliada à proximidade de distribuição geográfica das duas espécies na região centro-oeste da América do Sul, sugere que elas tenham compartilhado um ancestral comum recentemente.

Apesar de as distribuições geográficas atuais de *B. marmoratus, B. lutzi* e *B. pauloensis* não refletirem necessariamente a ocupação ancestral, Silva (2000) sugeriu que as ocorrências contíguas em algumas áreas e as sobreposições das três espécies em Brasília (DF) corroboram uma origem comum, muito provavelmente nos Cerrados do Brasil Central.

Quanto à relação de *B. neuwiedi* com *B. pubescens*, aventou-se que as duas espécies faziam parte de uma população da região leste da América do Sul, que sofreu fragmentação (Silva, 2000). Como resultado, tais espécies não se diferenciaram completamente, uma vez que existem registros de formas intermediárias, identificadas como híbridas (Amaral, 1930; Lema *et al.*, 1984; Silva, 2000).

Silva (2000) ressaltou dois extremos verificados entre as espécies estudadas: populações isoladas, mas morfologicamente indistintas pela falta de tempo para a especiação, conforme observado com *B. mattogrossensis* em Humaitá (AM) e *B. neuwiedi* em Itiúba (BA); e populações em simpatria e completamente distintas, como ocorre com *B. neuwiedi* e *B. pauloensis* no Estado de São Paulo.

Com base neste histórico, esclarecimentos sobre o grupo *neuwiedi* são extremamente relevantes por causa do impacto na saúde. A questão dos acidentes ofídicos é tão importante que a sua notificação ao Sistema de Informação de Notificação de Agravos (SINAN) do Ministério da Saúde tornou-se obrigatória. O grupo *neuwiedi* foi apontado como o terceiro mais comum entre as serpentes recebidas pelo Instituto Butantan, de 1900 a 1962 (Belluomini, 1971). Em levantamento realizado por Rojas *et al.* (2007), foi o terceiro maior responsável pelos acidentes provocados por *Bothrops* no noroeste do Estado de São Paulo, e em algumas regiões chega a ser o maior responsável, como na região nordeste (Castro, 2008).

Pouco conhecimento foi acumulado na última década sobre as espécies grupo *neuwiedi* desde a revisão taxonômica realizada por Silva (2000, 2004) e Silva & Rodrigues (2008). Apenas alguns trabalhos enfocando a ecologia e biologia reprodutiva foram desenvolvidos, permanecendo uma grande lacuna na compreensão da história evolutiva e diversidade deste grupo de serpentes Neotropicais (Martins *et al.*, 2001, 2002; Valdujo *et al.*, 2002; Hartmann *et al.*, 2005; Monteiro *et al.*, 2006).

1.6. Abordagens moleculares: considerações sobre inferências filogenéticas baseadas em sequências de DNA

Os estudos de inferência filogenética buscam levantar as hipóteses mais prováveis de relações de parentesco entre os organismos atuais e fósseis, partindo da premissa de que eles estão interligados por relações de ancestralidade comum (Moritz & Hillis, 1996; Wheeler *et al.*, 2006).

Quando os dados são sequências de bases do DNA, as evidências são as mudanças genéticas detectadas nessa molécula, como a substituição simples de bases, adições/deleções e, em menor número, alterações envolvendo grandes diferenças que são usualmente encontradas na região controladora (Nichols, 2001).

As metodologias mais comumente empregadas para estimativas filogenéticas são: máxima parcimônia (MP), na qual a árvore filogenética preferencial é aquela que requer o menor número de mudanças evolutivas (Albert, 2006); máxima verossimilhança (MV), método estatístico que assume um modelo de evolução molecular para determinado alinhamento de sequências, otimizando todos os parâmetros desse modelo até que se obtenha o máximo de probabilidade global (Felsenstein, 1981); e análise bayesiana (AB), que utiliza simulações de cadeias de Markov, nas quais todos os parâmetros do modelo são tratados como variáveis aleatórias, inclusive a própria filogenia, gerando uma amostragem *a posteriori*, que é proporcional à probabilidade posterior da melhor filogenia, dado o alinhamento (Larget, 2005).

Algumas críticas à máxima parcimônia são o pressuposto de taxas evolutivas homogêneas nos diferentes sítios e a possibilidade de ocorrência do fenômeno de atração de ramos longos (Felsenstein, 1981), onde nós que unem ramos que sofreram mais substituições podem ser resgatados com probabilidade não-trivial, e de forma consistente, do ponto de vista estatístico. A máxima verossimilhança e a análise bayesiana são métodos que utilizam modelos evolutivos, que permitem a correção da subestimativa da distância entre as sequências (Felsenstein, 2004). No entanto, o número de premissas aumenta significativamente em função do modelo

escolhido, e, se a escolha não for adequada, pode resultar na recuperação de grupos monofiléticos incorretos (Felsenstein, 2004).

O marcador molecular mais amplamente utilizado em estudos filogenéticos e filogeográficos é o DNA mitocondrial (DNAmt), que se tornou popular na década de 1970, quando foram realizados os primeiros estudos com fragmentos de DNA de diferentes tamanhos (RFLP – *Restriction Fragments Length Polymorphism*), gerados pela ação de enzimas de restrição (Avise, 2004).

Com o advento das técnicas de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), o DNAmt tornou-se uma ferramenta poderosa em abordagens moleculares, por meio do sequenciamento de genes, e, mais recentemente, em trabalhos baseados no genoma mitocondrial total (Avise, 2004, 2009).

1.7. O DNA mitocondrial em serpentes

Os genes mitocondriais têm sido alvo dos estudos herpetológicos, como em diversos outros grupos de vertebrados, que visam a distinção de populações de uma mesma espécie e suas histórias evolutivas (Grazziotin *et al.*, 2006; Castoe *et al.*, 2009), relações filogenéticas (Kraus *et al.*, 1996; Parkinson, 1999; Wüster *et al.*, 2002a, 2002b; Castoe & Parkinson, 2006; Geurgas *et al.*, 2008, Fenwick *et al.*, 2009), definição de espécies (Puorto *et al.*, 2001; Wiens & Penkrot, 2002; Kelly *et al.*, 2008), e a evolução dos genes mitocondriais (Kumazawa *et al.*, 1996; Jiang *et al.*, 2007).

Entre os viperídeos Neotropicais, os genes amplamente utilizados para este tipo de abordagem foram o cyt *b* e ND4. Posteriormente, alguns trabalhos empregaram sequências dos genes ribossomais 12S e 16S (Wüster *et al.*, 1999, 2002a, 2002b, 2008; Slowinski & Lawson, 2002; Castoe & Parkinson, 2006; Sanders *et al.*, 2006; Fenwick *et al.*, 2009). Mais recentemente, os estudos filogenéticos têm sido baseados na combinação de informações de genes nucleares associados aos marcadores mitocondriais, na tentativa de estimar árvores de espécies mais próximas da verdadeira, pois diferentes regiões genômicas podem ter diferentes histórias evolutivas ao longo dos ramos de uma árvore de relações de espécies. Com esta tendência, também surgiram novos desafios a serem superados, como por exemplo, a discordância entre as árvores de genes mitocondriais e nucleares (Avise, 2004; Slowinski & Lawson, 2002; Degnan & Rosenberg, 2006, 2009; Castoe *et al.*, 2007; Hedges *et al.*, 2009).

O conteúdo gênico mitocondrial em vertebrados é relativamente conservado, mas se observam rearranjos na ordem gênica em alguns grupos como anfíbios, aves e marsupiais (Yoneyama, 1987; Desjardins & Morais, 1990; Pääbo *et al.*, 1991).

As serpentes possuem características pouco comuns dentre outros vertebrados, incluindo genes mais curtos, RNAs transportadores truncados, região controle duplicada e taxas evolutivas mais aceleradas (Kumazawa *et al.*, 1996, 1998; Dong & Kumazawa, 2005; Jiang *et al.*, 2007).

A duplicação da região controle é uma sinapomorfia de Alethinophidia (Dong & Kumazawa, 2005; Jiang *et al.*, 2007) e foi verificada uma surpreendente semelhança entre as regiões controle de indivíduos da mesma espécie, comparável à encontrada para os genes ribossomais (Jiang *et al.*, 2007) (Figura 15). Devido essa homogeneidade das sequências nucleotídicas, Jiang *et al.* (2007) sugerem que as duas regiões estejam sob evolução em concerto.

Somente alguns trabalhos foram realizados com intuito de esclarecer a história evolutiva de serpentes Neotropicais, portanto, o padrão de diversificação destes organismos ainda é pouco compreendido (Wüster *et al.*, 1999, 2002a, 2002b, 2005b, 2008; Slowinski & Lawson, 2002; Castoe & Parkinson, 2006; Grazziotin *et al.*, 2006; Sanders *et al.*, 2006; Daza *et al.*, 2009; Fenwick *et al.*, 2009).

O entendimento sobre a evolução destas serpentes torna-se ainda mais difícil, dada a complexidade abiótica e biótica da região Neotropical, a qual impede que generalizações sejam feitas com relação aos processos evolutivos históricos responsáveis pela diversidade observada na região (Daza *et al.*, 2009).

Neste contexto, as espécies do grupo *neuwiedi*, amplamente distribuídas e pouco compreendidas até o momento, desmonstram ser um excelente exemplo de biodiversidade a ser estudado.

15

Tabela 1. Estimativa do número de espécies da Ordem Squamata por grupo taxonômico (Uetz, 2009; Oguiura *et al.*, 2010).

Grupo taxonômico	Nº espécies		
I. Ordem Squamata			
II. Subordem Sauria (Lagartos)	5080		
Subordem Amphisbaenia (Anfisbenas)	200		
Subordem Serpentes	3150		
III. Infraordem Scolecophidia	380		
Infraordem Alethinophidia	2770		
IV. Parvordem Amerophidia	24		
Parvordem Henophidia	200		
Parvordem Caenophidia	2570		
V. Família Viperidae	270		
VI. Subfamília Viperinae	62		
Subfamília Azemiopinae	1		
Subfamília Crotalinae	207		

Tabela 2. Compilação dos dados sobre o complexo *neuwiedi*, a partir de Silva (2000, 2004) e Silva & Rodrigues (2008), com táxonsválidos e alguns de seus sinônimos.

Táxons válidos	Sinônimos	Características morfológicas				
B. neuwiedi (Wagler, 1824)	B. n. neuwiedi (Amaral, 1925) B. n. goyazensis (Amaral, 1925) B. n. paranaensis (Amaral, 1925) B. urutu (Lacerda, 1884), B. n. minasensis (Amaral, 1925), B. n. urutu (Amaral, 1937; Hoge, 1966) B. atrox meridionalis (Cope, 1885), B. n. fluminensis (Amaral, 1933), B. n. meridionalis (Hoge, 1966)	Vanchas dorsais de oordas bem marcadas e				
<i>B. mattogrossensis</i> (Amaral, 1925)	<i>B. n. mattogrossensis</i> (Amaral, 1925) <i>B. n. boliviana</i> (Amaral, 1927), <i>B. n. bolivianus</i> (Hoge, 1966)	presença de manchas				
<i>B. pubescens</i> (Cope, 1870)	<i>pubescens</i> ppe, 1870) Trigonocephalus pubescens (Cope, 1870), <i>B. n. riograndensis</i> (Amaral, 1925), <i>B. n. pubescens</i> (Hoge, 1959, 1966)					
B. diporus (Cope, 1862)	B. n. meridionalis (Amaral, 1930), B. n. diporus (Cochran, 1961; Hoge, 1966)					
B. pauloensis (Amaral, 1925)	<i>B. n. pauloensis</i> (Amaral, 1925)	Manchas dorsais de				
B. lutzi (Miranda-Ribeiro, 1915)	Lachesis lutzi (Miranda-Ribeiro, 1915), <i>B. n. bahiensis</i> (Amaral, 1925), <i>B. n. lutzi</i> (Amaral, 1930; Hoge, 1966) <i>B. n. piauhyensis</i> (Amaral, 1925) <i>B. iglesiasi</i> (Amaral, 1923)	manchas intercalares				
<i>B. marmoratus</i> (Silva & Rodrigues, 2008)		nítidas				

Tabela 3. Dados sobre a sobreposição da distribuição geográfica de sete espécies do grupo *neuwiedi* e número de ocorrência de simpatria comprovada das espécies (Silva, 2000, 2004; Silva & Rodrigues, 2008).

		B. diporus	B. lutzi	B. mattogrossensis	B. marmoratus	B. neuwiedi	B. pauloensis	B. pubescens
Sobreposição da distribuição geográfica	B. diporus	-		Х		х	Х	Х
	B. lutzi		-		Х	х	х	
	B. mattogrossensis	х		-		х	х	
	B. marmoratus		Х		-	х	х	
	B. neuwiedi	х	Х	Х	Х	-	х	
	B. pauloensis	х	Х	Х	Х	х	-	
	B. pubescens	х						-
Ocorrência de Simpatria	B. diporus	-						
	B. lutzi		-					
	B. mattogrossensis		1	-				
	B. marmoratus				-			
	B. neuwiedi				2	-		
	B. pauloensis		1	9	3	12	-	
	B. pubescens	1						-



Figura 1. Relações filogenéticas da Ordem Squamata baseadas em sequências dos genes nucleares *Rag1* (gene de ativação de recombinação 1) e c-*Mos* (proto-oncogene do sarcoma de Moloney) (Vidal & Hedges, 2004). Em destaque, as infraordens Scolecophidia (em azul) e Alethinophidia (em vermelho), que compõem a Subordem Serpentes.



Figura 2. Distribuição de viperídeos, com destaque para a riqueza de espécies, segundo Terribile *et al.* (2009).



Figura 3. Relações filogenéticas entre membros da família Viperidae baseadas em sequências de genes mitocondriais (cyt *b*, ND4, 12S e 16S). Árvore parcial de inferência bayesiana retirada de Wüster *et al.* (2008).



Figura 4. Relações filogenéticas da Subfamília Crotaline para os gêneros que ocorrem no continente americano. Árvores de inferência bayesiana baseadas em sequências do cyt *b*, 12S, 16S e ND4 do DNA mitocondrial, adaptadas das propostas de: **(A)** Wüster *et al.* (2008) e **(B)** Castoe *et al.* (2009). Em destaque a posição de *Bothriechis* e os suportes encontrados para sua relação com demais os gêneros.



Figura 5. Relações filogenéticas propostas por Fenwick *et al.* (2009). Filograma de consenso de 50% a partir de inferência bayesiana obtida de sequências de DNA mitocondrial (cyt *b*, 12S, 16S e ND4) e caracteres morfológicos. Em destaque os novos gêneros propostos; os táxons recuperados em locais alternativos nas análises são marcados com símbolo (+).



Figura 6. *Bothrops neuwiedi.* **(A)** Distribuição geográfica (Silva, 2004). **(B)** Exemplar de Irati, Paraná (foto de Nelson Jorge da Silva, retirada de Campbell & Lamar, 2004). **(C)** Padrão de manchas da espécie (Silva, 2004; Silva & Rodrigues, 2008).



Figura 7. *Bothrops diporus.* **(A)** Distribuição geográfica (Silva, 2004). **(B)** Exemplar de Tucunduva, Rio Grande do Sul (foto de Taís Machado). **(C)** Padrão de manchas da espécie (Silva, 2004; Silva & Rodrigues, 2008).



Figura 8. *Bothrops lutzi.* **(A)** Distribuição geográfica (Silva, 2004). **(B)** Exemplar de Uruçui-Una, Piauí (foto de Miguel T. Rodrigues retirada de Campbell & Lamar, 2004). **(C)** Padrão de manchas da espécie (Silva, 2004; Silva & Rodrigues, 2008).



Figura 9. *Bothrops mattogrossensis.* **(A)** Distribuição geográfica (Silva, 2004). **(B)** Exemplar da Chapada dos Guimarães, Mato Grosso (foto de Christine Strüssmann). **(C)** Padrão de manchas da espécie (Silva, 2004; Silva & Rodrigues, 2008).



Figura 10. Bothrops marmoratus. (A) Distribuição geográfica (Silva, 2004). (B) Exemplar de Leopoldo de Bulhões, Goiás (foto de Marta Magalhães). (C) Padrão de manchas da espécie (Silva, 2004; Silva & Rodrigues, 2008).



Figura 11. *Bothrops pauloensis.* **(A)** Distribuição geográfica (Silva, 2004). **(B)** Exemplar de Avaré, São Paulo (foto de Ivan Sazima retirada de Campbell & Lamar, 2004). **(C)** Padrão de manchas da espécie (Silva, 2004; Silva & Rodrigues, 2008).



Figura 12. *Bothrops pubescens.* **(A)** Distribuição geográfica (Silva, 2004). **(B)** Exemplar de Barra do Ribeiro, Rio Grande do Sul (foto de Taís Machado). **(C)** Padrão de manchas da espécie (Silva, 2004; Silva & Rodrigues, 2008).



Figura 13. Mapa com a sobreposição das distribuições geográficas das espécies do grupo *neuwiedi*, compilado a partir de Silva (2004).


Figura 14. Árvore de parcimônia baseada em dados morfológicos de *Bothrops* do grupo *neuwiedi* (Silva, 2000), com modificações.



Figura 15. Molécula de DNA mitocondrial típica de serpentes, com a região controle duplicada (Dong & Kumazawa, 2005).

2. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho é investigar as relações de parentesco das oito espécies de *Bothrops* do grupo *neuwiedi*, por meio de reconstruções filogenéticas obtidas a partir de sequências dos genes mitocondriais citocromo *b* e ND4, com o intuito de contribuir para a sistemática molecular do grupo, caracterizar os possíveis limites específicos e inferir eventuais processos evolutivos associados à história do grupo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

A grande maioria dos tecidos utilizados neste trabalho foi cedida por Bancos de Tecidos, criadouros de serpentes e doações particulares de alguns pesquisadores (Tabela 4).

Foram obtidas 140 amostras de espécimes do grupo *neuwiedi*, sendo quatro mudas, 81 fragmentos de escamas e 55 de fígado (Tabela 4). Foram amostradas 92 localidades de 13 estados brasileiros (Tabela 5, Figura 16).

Das 140 amostras, foi realizada a coleta de tecidos de 52 espécimes pelo nosso grupo: 49 amostras de escamas, sendo 27 do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan (IBu) e 22 do Núcleo de Ofiologia de Porto Alegre, e três amostras de fígado de *B. neuwiedi*, obtidas de animais sacrificados em nosso laboratório, (TM29, TM30 e TM31) procedentes de Baependi, MG (Figura 18).

Na Tabela 5 são apresentados os números de tombo dos exemplares depositados na Coleção Herpetológica "Alphonse Richard Hoge" - IBu (IBSP); no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP), Coleção Herpetológica da Universidade Nacional de Brasília (CHUNB) e Coleção Herpetológica da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

Pesquisadores colaboradores identificaram 14 exemplares de nossa amostra e o Dr. Vinícius Xavier da Silva confirmou a identificação de 125 espécimes (82 exemplares fotografados e 43 *vouchers* de coleção), segundo classificação taxonômica proposta por Silva (2000, 2004) e Silva & Rodrigues (2008) (Tabela 4). Apenas o espécime de Piracicaba (TM27) da coleção do IBu não teve a identificação confirmada, por extravio do *voucher* (Tabela 5). Cinco indivíduos apresentaram morfologia intermediária entre as espécies *B. neuwiedi*, *B. pauloensis*, *B. marmoratus* e *B. mattogrossensis*, que serão representados neste trabalho por *B. neuwiedi/pauloensis* (TM74 e TM75); *B. marmoratus/pauloensis* (TM127 e TM119); *B. marmoratus/mattogrossensis* (TM130). Estes morfotipos intermediários e os espécimes do estado de Goiás passaram por uma análise morfológica prévia em fotografias, mas necessitaram de confirmação posterior *in loco*, realizada pelo Dr. Vinícius Xavier da Silva (Tabelas 4 e 5).

Os genes sequenciados para cada um dos 140 exemplares são indicados na Tabela 5 e, adicionalmente, para compor as matrizes utilizadas nas análises, foram utilizadas sequências do GenBank (NCBI, 2009) de espécimes dos gêneros *Bothrops, Bothriopsis, Bothrocophias* e *Porthidium* (Tabela 6). **Tabela 4.** Listagem dos Bancos de Tecidos, criadouros de serpentes e pesquisadores que cederam amostras de tecido para este trabalho, número de amostras cedidas, tipo de tecido (E = escama, F= fígado, M = muda) e método utilizado para a identificação dos exemplares amostrados.

Doadores	Nº amostras	Tecido	Identificação
Coleção "Alphonse Richard Hoge" - IBu	34	31 F + 3 E	33 <i>vouchers</i> examinados*
Museu de Zoologia - USP	3	F	3 <i>vouchers</i> examinados*
Departamento de Zoologia - IBUSP	14	F	9 exemplares identificados pelo grupo do Dr. Miguel T. Rodrigues 5 <i>vouchers</i> examinados*
Coleção Herpetológica - UnB	1	F	Voucher examinado*
Laboratório de Animais Peçonhentos e Toxinas- UFPE	1	E	Por fotografia*
Universidade Passo Fundo	2	E	Identificados por Noeli Zanella e Simone Nunes
Laboratório Herpetologia – IBu	27	E	Por fotografia*
Núcleo Ofiológico de Porto Alegre	22	E	Por fotografia*
Universidade Federal da Bahia	1	Μ	Por fotografia*
Centro de Estudos e Pesquisas Biológicas - UCG	16	E	Por fotografia e examinados pessoalmente*
Centro de Biologia Molecular e Genômica - PUCRS	1	Μ	Identificado por Arlindo de Figueiredo Beda
Núcleo de Ofiologia Regional do Mato Grosso - UFMT	12	1 F + 11 E	Por fotografia*
Universidade Federal de Viçosa	1	Μ	Por fotografia*
Universidade Federal de Ouro Preto	2	F	Por fotografia*
Vinícius X. Silva – UNIFAL	1	Μ	Por fotografia*
Paula H. Valdujo - IBUSP	2	F	Identificados por Paula H. Valdujo

* Identificação realizada pelo Dr. Vinícius Xavier da Silva (UNIFAL)

Tabela 5. Listagem dos espécimes amostrados: espécie, número do laboratório, número de campo/tombo, procedência, coordenadas geográficas, tipo de tecido (E = escama, F= fígado, M = muda) e genes cujas sequências foram obtidas neste trabalho (cyt *b* e ND4).

Espécie	Nº Lab	№ campo/tombo	Localidade	UF	Latitude	Longitude	Tecido	cyt <i>b</i>	ND4
B. diporus	TM 65	BNF 9302-06	Itaipu	PR	-25.683	-54.433	E	Х	
	TM 66	BNF 9302-10	Itaipu	PR	-25.683	-54.433	E	Х	Х
	TM 214	3748	Chiapeta	RS	-27.923	-53.941	E	Х	Х
	TM 44	UPF 503	Constantina	RS	-27.735	-52.992	Е	Х	Х
	TM 45	UPF 561	Jóia	RS	-28.647	-54.122	E	Х	
	TM 213	3034	Jóia	RS	-28.647	-54.122	E		Х
	TM 198	3209 – E	Passo Fundo	RS	-28.263	-52.407	E	Х	
	TM 209	3230	Santiago	RS	-29.192	-54.867	E	Х	Х
	TM 215	3161H	Três Passos	RS	-27.456	-53.932	E	Х	Х
	TM 206	3810	Tucunduva	RS	-27.657	-54.440	Е	х	Х
	TM 208	3734	Tucunduva	RS	-27.657	-54.440	Е	х	Х
	TM 217	2277	Tuparendi	RS	-27.756	-54.482	Е	х	Х
	TM 16	IBSP 60323	Blumenau	SC	-26.919	-49.066	F	Х	Х
	TM 32	IBSP 60327	Blumenau	SC	-26.919	-49.066	F	х	Х
B. erythromelas	TM 58	MRT 3742	Alagoado	BA	-9.483	-41.350	F	Х	Х
	TM 02	7030681	Ibitira	BA	-12.652	-42.218	E	Х	Х
	TM 57	MTR 11185	Santo Inácio	BA	-11.065	-42.430	F	Х	Х
	TM 59	MRT 3497	Santo Inácio	BA	-11.065	-42.430	F	Х	Х
	TM 95	467	Petrolândia	PE	-9.069	-38.303	Е	Х	Х
B. lutzi	TM 223	3699	Ibiraba	BA	-10.800	-42.833	М	Х	Х
	TM 108	PHV 1479	Jaborandi	BA	-14.482	-45.858	F	Х	Х
	TM 109	PHV 1994	Jaborandi	BA	-14.319	-45.924	F	Х	
	TM 60	MZUSP 12536	Uruçuí-Una	ΡI	-7.229	-44.556	F	Х	Х
	TM 104	MTR 14196	EESGT (Estação Ecológica Serra Geral do Tocantins)	то	-10.744	-47.536	F	х	Х
	TM 105	MTR 14488	EESGT	то	-10.744	-47.536	F	х	
	TM 106	MTR 14800	EESGT	то	-10.744	-47.536	F	х	
B. marmoratus	TM 148	CHUNB19281	Reserva Ecológica do IBGE (RECOR)	DF	-15.944	-47.885	F	Х	Х
	TM 118	8171	Goiânia	GO	-16.679	-49.254	Е	Х	Х
	TM 116	6511	Hidrolândia	GO	-16.962	-49.229	Е	Х	Х

Espécie	Nº Lab	Nº campo/tombo	Localidade	UF	Latitude	Longitude	Tecido	cyt <i>b</i>	ND4
B. marmoratus	TM 111	13422	Jataí	GO	-17.881	-51.714	E	х	х
	TM 129	12742	Leopoldo de Bulhões	GO	-16.619	-48.744	Е	Х	Х
	TM 113	14067	Luziânia	GO	-16.253	-47.95	Е	Х	Х
	TM 131	MZUSP 15006	Serra da Canastra - São Roque de Minas	MG	-20.245	-46.366	F	Х	
	TM 17	IBSP 73286	Serra do Salitre	MG	-19.111	-46.69	F	Х	Х
	TM 87	BN 0202	Lajeado	ТО	-9.751	-48.358	Е	Х	Х
	TM 88	BN 0203	Lajeado	ТО	-9.751	-48.358	Е	Х	Х
B. marmoratus/mattogrossensis	TM 130	12734	Caiapônia	GO	-16.957	-51.81	E	х	Х
B. marmoratus/pauloensis	TM 127	13237	Aporé	GO	-18.965	-51.926	E	Х	Х
	TM 119	13417	Hidrolândia	GO	-16.962	-49.229	Е	х	х
B. mattogrossensis	TM 176	CBGM833	Aquidauana	MS	-20.471	-55.787	М	Х	Х
Ū.	TM 168	NORMAT95	Chapada dos Guimarães	MT	-15.461	-55.75	Е	Х	Х
	TM 172	NORMAT113	Chapada dos Guimarães	MT	-15.461	-55.75	Е	Х	Х
	TM 154	NORMAT126	Cuiabá	MT	-15.596	-56.097	Е	Х	Х
	TM 157	NORMAT239	Cuiabá	MT	-15.596	-56.097	Е	Х	Х
	TM 160	NORMAT292	Cuiabá	MT	-15.596	-56.097	Е	х	х
	TM 161	NORMAT280	Cuiabá	MT	-15.596	-56.097	Е	х	Х
	TM 162	NORMAT109	Cuiabá	MT	-15.596	-56.097	Е	х	
	TM 164	NORMAT97	Cuiabá	MT	-15.596	-56.097	Е		х
	TM 169	NORMAT213	Cuiabá	MT	-15.596	-56.097	Е	Х	х
	TM 165	NORMAT199	Cuiabá	MT	-15.596	-56.097	Е		Х
	TM 173	-	Serra da Borda, V. Bela da Santíssima Trindade	MT	-15.008	-59.951	F	Х	
	TM 163	NORMAT134	Jauru, Vale de São Domingos	MT	-15.342	-58.866	E	Х	
B. neuwiedi	TM 28	IBSP 71063	Aiuruoca	MG	-20.025	-44.603	F	х	Х
	TM 72	BN 0101	Aiuruoca	MG	-20.025	-44.603	Е	Х	Х
	TM 73	BN 0318	Aiuruoca	MG	-20.025	-44.603	Е	х	
	TM 224	-	Alfenas	MG	-21.429	-45.947	М		Х
	TM 22	IBSP 73007	Andradas	MG	-22.068	-46.569	Е		Х
	TM 78	BN 0406	Andradas	MG	-22.068	-46.569	Е	х	х
	TM 10	IBSP 74565	Baependi	MG	-21.959	-44.89	F	х	х
	TM 29	IBSP 74563	Baependi	MG	-21.959	-44.89	F	х	х
	TM 30	IBSP 74564	Baependi	MG	-21.959	-44.89	F	Х	Х

Continuação Tabela 5.

ontinuação Tabela 5.									
spécie	Nº Lab	Nº campo/tombo	Localidade	UF	Latitude	Longitude	Tecido	cyt <i>b</i>	ND4
. neuwiedi	TM 31	IBSP 74566	Baependi	MG	-21.959	-44.89	F	х	Х
	TM 89	BN 9926	Congonhas	MG	-20.5	-43.858	Е	Х	
	TM 53	MTR 9979	Diamantina, Comarca de Biribiri	MG	-18.249	-43.6	F	Х	
	TM 110	-	Itabirito	MG	-20.253	-43.801	Μ	Х	
	TM 08	IBSP 74040	Machado	MG	-21.402	-45.551	F	Х	Х
	TM 79	BN 0309	Machado	MG	-21.402	-45.551	Е	Х	
	TM 84	BN 0413	Machado	MG	-21.402	-45.551	Е		Х
	TM 54	JC 870	Mariana	MG	-20.378	-43.416	F	Х	Х
	TM 91	MZUSP 15724	Mariana	MG	-20.378	-43.416	Е	Х	Х
	TM 12	IBSP 72925	Munhoz	MG	-22.613	-46.361	F	Х	Х
	TM 41	IBSP 73477	Munhoz	MG	-22.613	-46.361	F	Х	
	TM 76	BN 0203-02	Munhoz	MG	-22.613	-46.361	Е	Х	Х
	TM 136	UFOP 6315	Ouro Branco	MG	-20.521	-43.692	F	х	Х
	TM 142	UFOP 6645	Ouro Branco	MG	-20.521	-43.692	F	х	
	TM 83	BN 0410	Pocos de Caldas	MG	-21.788	-46.561	E	х	
	TM 07	IBSP 72736	São Gonçalo do Rio Preto	MG	-18.001	-43.232	F	х	Х
	TM 14	IBSP 74088	São Gonçalo do Rio Preto	MG	-18.001	-43.232	F	х	Х
	TM 05	IBSP 73004	São Vicente de Minas	MG	-21.713	-44.444	F	х	Х
	TM 33	IBSP 73005	São Vicente de Minas	MG	-21.713	-44.444	F	х	Х
	TM 38	IBSP 73006	São Vicente de Minas	MG	-21.713	-44.444	F	х	Х
	TM 09	IBSP 71102	Três Corações	MG	-21.697	-45.253	F	х	
	TM 80	BN 0319	Curitiba (CPPI)	PR	-25.428	-49.273	Е	х	Х
	TM 67	BN 9735	Jaguariaiva	PR	-24.251	-49.706	Е	х	
	TM 81	BN 0608	Araçariguama	SP	-23.439	-47.061	Е	х	Х
	TM 18	IBSP 74218	Areias	SP	-22.58	-44.697	F	х	
	TM 24	IBSP 72734	lbiúna	SP	-23.656	-47.223	F	х	Х
	TM 23	IBSP 70337	ltu	SP	-23.264	-47.299	F	Х	Х
	TM 42	IBSP 70723	ltu	SP	-23.264	-47.299	F	Х	Х
	TM 70	BN 0102	ltu	SP	-23.264	-47.299	Е	х	
	TM 71	BN 0108	ltu	SP	-23.264	-47.299	Е	х	
	TM 01	20007010726	Santana de Parnaíba	SP	-23.444	-46.918	Е	х	
	TM 15	IBSP 73292	Santo André	SP	-23.664	-46.538	F	х	Х
	TM 63	BN 0412	São Miguel Arcanjo	SP	-23.878	-47.997	Е	х	х

Espécie	Nº Lab	№ campo/tombo	Localidade	UF	Latitude	Longitude	Tecido	cyt <i>b</i>	ND4
B. neuwiedi	TM 77	BN 9809-05	São Simão	SP	-21.479	-47.551	Е	Х	Х
	TM 62	BN 0301	Socorro	SP	-22.591	-46.529	Е	Х	
	TM 25	IBSP 71611	Sorocaba	SP	-23.502	-47.458	F	Х	Х
	TM 19	IBSP 73637	Votorantim	SP	-23.547	-47.438	F	Х	Х
B. pauloensis	TM 128	12528	Aporé	GO	-18.965	-51.926	Е	Х	Х
	TM 124	12094	Goiânia	GO	-16.679	-49.254	Е	Х	Х
	TM 120	13598	Goiânia	GO	-16.679	-49.254	Е	Х	Х
	TM 112	11832	Jataí	GO	-17.881	-51.714	Е	Х	Х
	TM 115	15162	Jataí	GO	-17.881	-51.714	Е	Х	Х
	TM 55	E 134	Parque Nacional das Emas	GO	-18.630	-52.951	F	Х	
	TM 56	E 129	Parque Nacional das Emas	GO	-18.630	-52.951	F	Х	Х
	TM 114	12070	Serranópolis	GO	-18.306	-51.962	Е	Х	Х
	TM 125	12976	Silvânia	GO	-16.659	-48.608	Е	Х	Х
	TM 86	BP 0661	Araguari	MG	-18.385	-48.111	Е	Х	Х
	TM 37	IBSP 71110	Frutal	MG	-20.025	-48.941	F	Х	Х
	TM 03	IBSP 71111	Frutal	MG	-20.025	-48.941	F	Х	Х
	TM 85	BN 0321	Frutal	MG	-20.025	-48.941	Е	Х	Х
	TM 21	IBSP 71473	Prata	MG	-19.307	-48.924	F	Х	Х
	TM 39	IBSP 71474	Prata	MG	-19.307	-48.924	F	Х	Х
	TM 51	MZUSP 11849	APM Manso, Chapada dos Guimarães	MT	-14.50	-55.50	F	Х	Х
	TM 52	MZUSP 11851	APM Manso, Chapada dos Guimarães	MT	-14.50	-55.50	F	Х	Х
	TM 26	IBSP 71785	Analândia	SP	-22.126	-47.663	F		Х
	TM 13	ITS 357	Itirapina	SP	-22.253	-47.823	F	х	Х
	TM 61	BN 0501	Itirapina	SP	-22.253	-47.823	Е	Х	Х
	TM 11	IBSP 72943	Motuca	SP	-21.508	-48.151	F	Х	Х
	TM 04	IBSP 70827	São Manuel	SP	-22.731	-48.571	F	Х	Х
	TM 152	MZUSP 15681	UHE-Peixe Angical	то	-12.025	-48.539	F	х	
	TM 153	MZUSP 15546	UHE-Peixe Angical	то	-12.025	-48.539	F	Х	Х
B. neuwiedi/pauloensis	TM 74	BN 0605	Pardinho	SP	-23.081	-48.374	E	Х	Х
	TM 75	BN 0310	Patrocínio Paulista	SP	-20.639	-47.282	Е		Х
B. pubescens	TM 199	2934G	Bagé	RS	-31.331	-54.107	E	Х	Х
	TM 202	3860	Barão do Triunfo	RS	-30.388	-51.734	Е	Х	х

Continuação Tabela 5.

Continuação Tabela 5.									
Espécie	Nº Lab	Nº campo/tombo	Localidade	UF	Latitude	Longitude	Tecido	cyt <i>b</i>	ND4
B. pubescens	TM 193	3797	Barra do Ribeiro	RS	-30.291	-51.301	E	Х	Х
	TM 219	3314B	Cachoeira do Sul	RS	-30.039	-52.894	Е	Х	Х
	TM 200	3079	Camaquã	RS	-30.851	-51.812	Е	Х	Х
	TM 204	3681	Canguçu	RS	-31.395	-52.676	Е	Х	Х
	TM 197	3253	Chuvisca	RS	-30.758	-51.978	Е	Х	Х
	TM 203	3325	Eldorado do Sul	RS	-30.084	-51.616	Е	Х	Х
	TM 205	3842	Gravataí	RS	-29.944	-50.992	Е	Х	Х
	TM 185	2762	Pelotas	RS	-31.772	-52.343	Е	Х	Х
	TM 187	3218	Porto Alegre	RS	-30.033	-51.23	Е	Х	Х
	TM 201	3768	São Leopoldo	RS	-29.76	-51.147	Е		Х
	TM 192	3259	Sentinela do Sul	RS	-30.611	-51.579	Е		Х
	TM 183	3295B	Viamão	RS	-30.081	-51.023	E	Х	
Bothrops sp.	TM 27	IBSP 73209	Piracicaba	SP	-22.725	-47.649	F		х
9 espécies	140	espécimes	92 localidades	13 UF				130	116

Continuação Tabela 5.

Tabela 6. Listagem das sequências obtidas do GenBank (NCBI, 2009): espécies, localidades, genes com respectivos números de acesso, número do *voucher* e referência.

Espécie	Localidade	cyt <i>b</i>	ND4	Voucher	Referência
Bothriopsis bilineata	Equador, Morona Santiago, Macuma	AF292592	AF292630	FHGO 983	Wüster <i>et al</i> ., 2002a
Bothrocophias hyoprora	Equador, Morona Santiago, Macuma	AF292576	AF292614	FHGO 4005	Wüster <i>et al</i> ., 2002a
Bothrops alternatus	Pinhão (PR)	AF292579	AF292617	IB 55314	Wüster <i>et al</i> ., 2002a
Bothrops atrox	Sem localidade	AF292604	AF292642	FHGO coleção viva 1424	Wüster, unpublished
Bothrops diporus	Argentina, Castro Barros, La Rioja,	DQ305472	DQ305489	PT3404	Castoe & Parkinson, 2006
Bothrops diporus	Blumenau (SC)	AF292587	AF292625	IB 60327	Wüster, unpublished
Bothrops erythromelas	Guanambi (BA)	AF292588	AF292626	IB 55541	Wüster <i>et al</i> ., 2002a
Bothrops erythromelas	Piranhas (AL)	AY223600	U41877	RG 829	Parkinson <i>et al</i> ., 2002
Bothrops insularis	Ilha da Queimada Grande (SP)	AY223596	AF188705	WWWg	Parkinson <i>et al</i> ., 2002
Bothrops jararaca	Itirapina (SP)	EU867278	EU867290	MM19(6)	Fenwick <i>et al.</i> , 2009
Bothrops marmoratus	Minaçu (GO)	AF292586	AF292624	IB 57513	Wüster, unpublished
Bothrops neuwiedi	Angatuba (SP)	AF292585	AF292623	IB 55555	Wüster <i>et al</i> ., 2002a
Bothrops pauloensis	Sem localidade	EU867284	EU867296	CLP3	Fenwick <i>et al.</i> , 2009
Porthidium dunni	México	AY223581	AY223630	ENS9705	Parkinson <i>et al</i> ., 2002



Figura 16. Mapa parcial do Brasil (domínios morfoclimáticos), indicando as 92 localidades amostradas neste trabalho: 1. Alagoado (BA), 2. Ibiraba (BA), 3. Ibitira (BA), 4. Jaborandi (BA), 5. Santo Inácio (BA), 6. Reserva Ecológica do IBGE -RECOR (DF), 7. Aporé (GO), 8. Caiapônia (GO), 9. Goiânia (GO), 10. Hidrolândia (GO), 11. Jataí (GO), 12. Leopoldo de Bulhões (GO), 13. Luziânia (GO), 14. Orizona (GO), 15. Parque Nacional das Emas (GO), 16. Serranópolis (GO), 17. Silvânia (GO), 18. Aiuruoca (MG), 19. Alfenas (MG), 20. Andradas (MG), 21. Araguari (MG), 22. Baependi (MG), 23. Diamantina – Comarca de Biribiri (MG), 24. Congonhas (MG), 25. Frutal (MG), 26. Itabirito (MG), 27. Machado (MG), 28. Mariana (MG), 29. Munhoz (MG), 30. Ouro Branco (MG), 31. Poços de Caldas (MG), 32.

Prata (MG), 33. São Gonçalo do Rio Preto (MG), 34. São Vicente de Minas (MG), 35. Serra da Canastra (MG), 36. Serra do Salitre (MG), 37. Três Corações (MG), 38. Aquidauana (MS), 39. APM Manso (MT), 40. Chapada dos Guimarães (MT), 41. Cuiabá (MT), 42. Serra da Borda (MT), 43. Jauru (MT), 44. Petrolândia (PE), 45. Uruçuí-Una (PI), 46. Curitiba (PR), 47. Itaipu (PR), 48. Jaguariaiva (PR), 49. Bagé (RS), 50. Barão do Triunfo (RS), 51. Barra do Ribeiro (RS), 52. Cachoeira do Sul (RS), 53. Camaquã (RS), 54. Canguçu (RS), 55. Chiapeta (RS), 56. Chuvisca (RS), 57. Constantina (RS), 58. Eldorado do Sul (RS), 59. Gravataí (RS), 60. Jóia (RS), 61. Passo Fundo (RS), 62. Pelotas (RS), 63. Porto Alegre (RS), 64. Santiago (RS), 65. São Leopoldo (RS), 66. Sentinela do Sul (RS), 67. Três Passos (RS), 68. Tucunduva (RS), 69. Tuparendi (RS), 70. Viamão (RS), 71. Blumenau (SC), 72. Analândia (SP), 73. Araçariguama (SP), 74. Areias (SP), 75. Ibiuna (SP), 76. Itirapina (SP), 77. Itu (SP), 78. Motuca (SP), 79. Pardinho (SP), 80. Patrocínio Paulista (SP), 81. Piracicaba (SP), 82. Santana de Parnaíba (SP), 83. Santo André (SP), 84. São Manuel (SP), 85. São Miguel Arcanjo (SP), 86. São Simão (SP), 87. Socorro (SP), 88. Sorocaba (SP), 89. Votorantim (SP), 90. Estação Ecológica Serra Geral do Tocantins (TO), 91. Lajeado (TO), 92. Usina Hidrelétrica de Peixe - Angical (TO).

3.2. Métodos

3.2.1. Obtenção de tecidos para a extração de DNA

- Escama

O procedimento de obtenção de escamas é especialmente vantajoso por não provocar danos aos animais, que permanecem vivos.

Os passos seguidos para a retirada de escamas foram os seguintes:

1- Limpeza do material cirúrgico (pinça e tesoura) com formol 10%.

2- Retirada de dois a três fragmentos das escamas da região ventral do animal (Figura 18 A e B).

3- Fixação em microtubo com etanol absoluto, contendo etiqueta de papel vegetal com registro da espécie, número de identificação do animal e localidade (Figura 18C).

4- Aplicação de álcool iodado na região em que foram retiradas as escamas do exemplar.

5- Limpeza do material cirúrgico com formol 10% depois da retirada das escamas de cada animal.

6- Obtenção de fotos de cada indivíduo, mostrando região dorsal, cabeça e lateral da cabeça.



Figura 18. Procedimento de obtenção de escama. **(A e B)** Com o auxílio de pinça e tesoura, um fragmento da escama ventral é extraída. **(C)** A escama é depositada em um microtubo contendo etanol absoluto (Fotos: Breno Hamdan).

- Muda

Após realização da muda pelo indivíduo, a amostra extraída foi seca e guardada em envelope ou tubo com a identificação da espécie, número de identificação do animal e localidade.

- Fígado

O procedimento de obtenção de fígado foi realizado com animais que foram sacrificados em câmara de CO₂, de acordo com os procedimentos éticos no uso de animais e conforme aprovação do Comitê de Ética do Instituto Butantan (CEUAIB – Protocolo nº 343/06).

Os passos foram os seguintes:

1- Limpeza do material cirúrgico (pinça e tesoura) com formol 10%.

 Localização do coração do animal, com posterior incisão um palmo abaixo do coração.

3- Retirada de um pedaço do fígado, posteriormente cortado em fragmentos menores, para facilitar preservação.

4- Fixação em microtubo com etanol absoluto, contendo etiqueta de papel vegetal com o resgistro da espécie, número de campo/tombo do animal e localidade.

5- Limpeza do material cirúrgico com formol 10%.

3.2.2. Obtenção de sequências dos genes mitocondriais

- Extração de DNA

O DNA genômico total foi extraído de fragmentos de fígado, escama ou muda de serpentes, segundo o método descrito por Fetzner (1999), apresentado a seguir:

1- Retirar o excesso de líquido dos tecidos conservados em etanol, pressionando-os em papel absorvente até ficarem relativamente secos.

2- Cortar os tecidos secos (incluindo mudas) em pequenos fragmentos, e transferir para um tubo de 1,8 mL.

3- Adicionar à amostra 300 μ L de solução de lise (Tris base 10 mM; EDTA 100 mM; SDS 2%, pH 8) e 3 μ L de Proteinase K (20 mg/mL). Manter em banhomaria à temperatura de 55°C por 24 horas no caso do fígado, e 48 horas para mudas e escamas.

4- Adicionar às amostras, após atingirem temperatura ambiente, 4 μ L de RNAse (10 mg/mL). Manter a solução em banho-maria por uma hora a 37°C.

5- Adicionar 300 μL de acetato de amônio (7,5 M), agitar em vórtex por 10 segundos e incubar no gelo por 30 minutos.

6- Centrifugar as amostras por 10 minutos a 13.000 rpm para a precipitação das proteínas, RNAs e outras moléculas.

7- Transferir o sobrenadante contendo DNA para um novo tubo, adicionar 500 μ L de isopropanol absoluto para a precipitação do DNA. Inverter os tubos por cerca de 20 vezes e deixar por aproximadamente 12 horas em freezer a -20^oC.

8- Centrifugar as amostras por 10 minutos a 13.000 rpm; descartar o sobrenadante e adicionar 500 μ L de etanol 70% para a lavagem do *pellet* de DNA.

9- Centrifugar as amostras novamente por 10 minutos a 13.000 rpm e descartar o etanol cuidadosamente. Inverter os tubos em papel absorvente e colocar em estufa a 37ºC por 15 a 30 minutos, para a eliminação total do etanol.

10- Adicionar de 30 a 100 μL (dependendo do tamanho do *pellet*) de tampão TLE (Tris base 10 mM; EDTA 0,1mM; pH 8.0) para a hidratação do DNA. Estocar as amostras em geladeira (4^oC) por 24 a 48 horas, e após este período quantificar as amostras em espectrofotômetro.

11- Fazer uma alíquota na concentração de 20 ng/μL e estocar a -20ºC para posterior amplificação dos fragmentos de interesse.

- Amplificação de fragmentos do citocromo b e ND4

Fragmentos dos genes mitocondriais de interesse, citocromo *b* (cyt *b*) e NADH desidrogenase subunidade 4 (ND4), foram amplificados utilizando oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), cujas sequências estão apresentadas na Tabela 7. Os *primers* delimitam uma região de 378 pares de bases (pb) do cyt *b* e 640 pb do ND4.

Primer	Gene	Cadeia	Sequência	Referência
LGL 765	cyt b	L	GAA AAA CCA YCG TTG TWA TTC AAC T	Bickham et al.,1995
H15149	cyt b	Н	TGC AGC CCC TCA GAA TGA TAT TTG TCC TCA	Kocher <i>et al</i> ., 1989
ND4F	ND4	L	CAC CTA TGA CTA CCA AAA GCT CAT GTA GAA GC	Arévalo <i>et al</i> ., 1994
LEU	ND4	Н	CAT TAC TTT TAC TTG GAT TTG GAC CA	Arévalo <i>et al</i> ., 1994

Tabela 7. Relação dos primers utilizados no presente trabalho.

- Solução para amplificação de fragmentos

Para um volume final de 25 μ L para a reação de PCR adicionar:

- **1-** 3,25 μ L da amostra de DNA (20 ng/ μ L)
- 2-11 µL de água milli-Q
- **3-** 2,5 μL de Tampão (Tris-HCl 200 mM; KCl 500 mM; pH 8,4)
- 4-1,5 µL de Cloreto de Magnésio (25 mM)

5- 2,5 μL de dNTP (2 mM)

6- 2,0 μ L de *primer* da cadeia leve (5 μ M)

7- 2,0 μ L de *primer* da cadeia pesada (5 μ M)

8- 0,25 μ L de Taq polimerase (5 U/ μ L).

- Regime de temperaturas da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A amplificação dos fragmentos de interesse foi realizada em termociclador (Techne TC-3000 – Analítica), sob o seguinte regime de temperaturas:

1- desnaturação inicial 94 °C/5 min

2-35 ciclos (cyt b) e 40 ciclos (ND4) de: desnaturação 94 °C/40 s

hibridação 48°C/45 s

extensão 72°C/40 s

3- extensão final a 72 °C/10 min.

- Verificação dos produtos de amplificação em gel de agarose

Para verificação da qualidade dos produtos de PCR e tamanho das bandas amplificadas, foi utilizado gel de agarose 1%, conforme procedimento a seguir:

1- Para uma cuba pequena de eletroforese (Horizon 58 - Life Technologies), em um Erlenmeyer adicionar 0,3 g de agarose em 30 mL de TAE.

2- Fundir em forno microondas com potência alta por 60 segundos.

3- Adicionar 0,5 µL do corante de ácidos nucléicos (GelRed - Biotium).

4- Depositar a solução do gel na forma ainda líquida no suporte da cuba de eletroforese.

5- Após solidificação, transferir o gel para a cuba, prosseguir com a aplicação de 2 μ L de DNA de cada uma das amostras misturadas com 2 μ L de solução de azul de bromofenol (BlueJuice - Invitrogen), diluído em água milli-Q (1:4).

6- Utilizar um marcador de peso molecular (Low DNA Mass Ladder - Invitrogen), sempre fazer controle negativo para monitorar possíveis contaminações e controle positivo com amostras que já foram amplificadas.

7- Realizar a eletroforese a 60 V, por 30 minutos.

8- Analisar o gel em transiluminador ultravioleta com sistema de captura de imagem.

- Purificação de fragmentos amplificados

A purificação dos produtos de PCR foi realizada com as enzimas Exonuclease I de *E. coli* (Exo), 20 U/ μ L, e Fosfatase Alcalina de Camarão (SAP), 1 U/ μ L (Fermentas).

1- Adicionar 0,5 μL de Exo e 2,0 μL de SAP para cada 7 μL de produto de PCR.

2- Submeter as amostras à temperatura de 37°C por 15 minutos e 80°C por 15 minutos em termociclador.

3- Verificar a amplificação dos fragmentos em gel de agarose 1%, como descrito no item anterior.

4- Estimar a concentração em função do marcador (Low DNA Mass Ladder - Invitrogen).

- Reação de sequenciamento de produtos de PCR

Os sequenciamentos foram realizados no Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan, em sequenciador automático (3100 Genetic Analyzer - Applied Biosystems). As reações de sequenciamento foram realizadas em termociclador (PTC-100 - MJ Research), utilizando 40 ciclos de 94°C (10s), 52°C (20s), 60°C (4min).

Para cada amostra a ser sequenciada, foram incluídos:

1- 6 μ L da amostra de DNA a 20 ng/ μ L

2- 1 μ L de *primer* a 2,5 μ M

3- 3 μL de tampão (200 mM TrisHCl pH 9.0 com 5mM MgCl₂)

4- 1 μ L de "Big Dye V3.1" (Big Dye Terminator Cycle Sequencing Standart - Applied Biosystems).

- Purificação e precipitação dos produtos de sequenciamento

A precipitação dos produtos de sequenciamento, foi realizada de acordo com os seguintes passos:

1- Adicionar 100 μ L de isopropanol 75% e centrifugar por 60 minutos a 4.000 rpm.

2- Lavar o precipitado com 150 μL etanol 70% e centrifugar por 10 minutos a 4.000 rpm.

3- Repetir a operação anterior.

4- Secar o DNA em estufa a 37° C por 30 minutos e ressuspender em 10 µL de formamida Hi-Di, desnaturar a 94° C por 4 minutos, e deixar em gelo por 5 minutos.

3.3. Análise das sequências

- Correção de ambiguidades das sequências

Os arquivos gerados pelo sequenciador, contendo as sequências e seus respectivos eletroferogramas, foram analisados no programa CodonCode Aligner 3.0 (LI-COR Inc), que permite a verificação automática da qualidade das sequências pelo programa PHRED, que também calcula a probabilidade de erro para a leitura de cada base. Um algoritmo baseado em valores de qualidade foi utilizado para retirar automaticamente as regiões de baixa qualidade do início e final das sequências. Para a comparação da cadeia leve com a pesada, foi utilizado o programa PHRAP, de modo a corrigir sítios nos casos em que a base não era claramente estabelecida em uma das cadeias, de forma automática, por meio de um consenso baseado na qualidade das sequências. Tal consenso foi, então, checado manualmente, para minimizar ainda mais eventuais erros quanto à base correta. Verificou-se também se não havia inserções/deleções/substituições nas sequências. que provocassem alteração no quadro de leitura, mudança drástica na sequencia de aminoácidos, e/ou gerassem um códon de parada prematuro.

- Pesquisa comparativa de similaridade

O CodonCode Aligner 3.0 (LI-COR Inc) possui uma interface com o GenBank, na qual se realizou a pesquisa comparativa de similaridade pelo Blastn (*nucleotide Basic Local Alignment Search Tool*) para verificar eventuais contaminações e se os fragmentos em questão correspondiam de fato, à sequência alvo.

- Importação de sequências do GenBank

Foi realizada uma busca no GenBank (NCBI, 2009) por sequências que poderiam ser informativas para a análise em conjunto com os dados obtidos, pelo programa BioEdit (Hall, 1999).

- Alinhamento

O alinhamento múltiplo foi realizado automaticamente pela interface com o programa MUSCLE (Edgar, 2004) existente no CodonCode Aligner 3.0 (LI-COR Inc). Foi conferida a tradução dos códons em aminoácidos para checagem de eventuais alterações no quadro de leitura.

3.4. Análise dos dados

- Matrizes

Foram realizados testes com uma matriz contendo todas as sequências obtidas neste trabalho para 140 táxons, mais as sequências para 42 táxons do GenBank (Anexo 1), para a verificação do posicionamento das sequências alvo em relação as demais espécies de *Bothrops, Bothriopsis* e *Bothrocophias*. Esta análise inicial, que não será apresentada aqui, também foi útil para a escolha do grupo externo para o enraizamento da árvore das análises do grupo *neuwiedi*. Após esta análise, três matrizes reduzidas foram construídas com o intuito de exploração dos dados voltada a diferentes aspectos, e também para agilizar o tempo computacional de cada uma dessas análises para o grupo *neuwiedi*:

• Matriz 1: composta por 149 táxons com sequências de 1018 pb (378 pb do cyt *b* e 640 pb do ND4), dos quais 140 táxons são pertencentes ao grupo *neuwiedi* (Tabela 5), dois táxons ao grupo *jararaca* e sete ao grupo *neuwiedi* disponíveis no GenBank (Tabela 6). Esta matriz foi utilizada nas seguintes análises: proporção de sítios invariáveis, variáveis e parcimônia-informativos; verificação de sequências idênticas; obtenção dos modelos evolutivos e sistema de particionamento.

• Matriz 2: constituída por 125 táxons contendo 1018 pb (378 pb do cyt *b* e 640 pb do ND4). Esta matriz foi construída a partir da Matriz 1, da qual foram excluídas 24 sequências idênticas (Tabela 11). Possui 117 táxons do grupo *neuwiedi* (Tabela 5), dois táxons do grupo *jararaca* e seis do grupo *neuwiedi* disponíveis no GenBank (Tabela 6), utilizada somente nas análises filogenéticas.

• Matriz 3: composta por 130 táxons contendo 378 pb do cyt *b* com a adição de sete sequências retiradas do GenBank (*Porthidium dunni*, *Bothrocophias hyoprora*, *Bothriopsis bilineata*, *Bothrops atrox*, *Bothrops alternatus*, *Bothrops insularis* e *Bothrops jararaca*), utilizada somente para cálculo de distância genética.

- Análises das sequências

A partir da Matriz 1, foram realizadas as análises de proporção de sítios invariáveis, variáveis e parcimônia-informativos no programa MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2007), e análise para verificação de sequências idênticas, realizada no RAxML v7.2.3 (Stamatakis, 2006).

As distâncias genéticas entre as sequências foram calculadas utilizando-se a Matriz 3 no PAUP 4.0b10 (Swofford, 2001), corrigidas com o modelo K2P (Kimura - 2 parâmetros) (Kimura, 1980). Foram utilizadas somente as distâncias corrigidas do gene cyt *b* para comparação com as distâncias genéticas descritas na literatura para serpentes, que empregam frequentemente esta metodologia. A mesma análise foi realizada com o ND4 separadamente, e também utilizando-se este em conjunto com o cyt *b*, resultando ambas em padrões similares à análise do cyt *b* isoladamente (dados não mostrados).

Obtenção dos modelos evolutivos e análises de particionamento

A escolha dos modelos evolutivos para máxima verossimilhança (MV) e análise bayesiana (AB) foi realizada com a Matriz 1, empregando-se o Modeltest 3.7 (Posada & Crandall, 1998). Os modelos foram selecionados pelo critério Akaike corrigido para um número amostral relativamente pequeno (AICc), levando-se em conta o número de ramos (k), e assumindo como número amostral (n) o tamanho total do alinhamento (Posada & Buckley, 2004) (Tabela 8).

Um importante desafio para a escolha dos modelos evolutivos é a heterogeneidade nas taxas evolutivas entre genes e sítios nucleotídicos (Buckley *et al.*, 2001). Para melhorar o desempenho da MV e AB, o particionamento dos dados, por genes e/ou por posição no códon, tem sido utilizado como alternativa (Brown & Lemmon, 2007; Castoe & Parkinson, 2006; Li *et al.*, 2008; Miller *et al.*, 2009). O particionamento excessivo dos dados pode levar a um aumento dos parâmetros além do necessário, acarretando em falta de informatividade para inferências de taxas em cada partição, e por outro lado a ausência de particionamento quando este se mostra necessário pode acarretar em menor precisão das estimativas. Ambos os casos podem levar a estimativas equivocadas e aumentam o risco de erro na reconstrução filogenética (Brown & Lemmon, 2007). Portanto, torna-se necessário um critério objetivo de escolha do melhor particionamento. Assim sendo, foram realizadas análises de MV no Treefinder (Jobb *et al.*, 2004) para determinação do

melhor sistema de particionamento do alinhamento total (Matriz 1), dados 4 sistemas possíveis escolhidos *a priori*: análise total (sem partição), partição por genes (duas partições), partição por posição no códon (três partições) e partição por gene e posição no códon (seis partições), empregando-se os modelos evolutivos obtidos para cada partição (Tabela 8). Para cada árvore final obtida, foram calculados os valores de MV e número de parâmetros utilizados pelo modelo estatístico (k), sendo o número de pares de bases da sequência (1018) considerado o número amostral (n). O melhor sistema de particionamento foi aquele com menor valor de AICc (Tabela 9). O método utilizado no presente estudo é diferente dos propostos por Li *et al.* (2008) - análise de agrupamentos - e por Miller *et al.* (2009) - análise dos valores de log natural de verossimilhança - mas é baseado numa metodologia bem embasada para escolha geral entre diferentes modelos (AICc). Os resultados aqui obtidos são similares ao dos autores acima citados: a partição por códon mostrou-se superior aos outros sistemas de particionamento.

- Análises de reconstrução filogenética

A Matriz 2 foi utilizada nas três análises de reconstrução filogenética realizadas: AB, MV e máxima parcimônia (MP).

Para a análise de MP foi utilizado o TNT 1.1 (Goloboff, 2008). Foram empregados quatro algoritmos diferentes combinados (*sectorial search*, *drifiting*, *ratchet* e *fusing*) para a busca heurística das árvores mais parcimoniosas, além do algoritmo de rearranjo de ramos padrão do tipo TBR (*tree bisection and reconnection*), sendo o restante das opções utilizadas da forma padrão. Os valores de suporte dos ramos foram estimados a partir de 1000 réplicas de *bootstrap* (Felsenstein, 1985).

A análise MV foi realizada no Treefinder (Jobb *et al.*, 2004), com 1000 réplicas de *bootstrap*, usando o particionamento por posição no códon (Tabelas 8 e 9).

A AB foi realizada pelo MrBayes v.3.0b4 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003), com particionamento por códon (Tabelas 8 e 9). Nos casos em que o modelo sugerido não se encontrava no MrBayes, foi escolhido o modelo complexo mais próximo ao sugerido pelo Modeltest (Huelsenbeck & Ronquist, 2005; Posada & Crandall, 1998). Foram realizadas duas corridas simultâneas, cada uma com quatro cadeias de Markov amostradas a cada 1000 gerações, para dez milhões de gerações. Foram utilizados para a análise: corte de 25% das gerações iniciais (*burnin*), parâmetros independentes por partição, topologias fixas para todas as partições a cada geração da cadeia, e distribuições das premissas (*priors*) com opções-padrão. As análises foram desempenhadas em versões paralelas gratuitas, disponíveis na internet: Bioportal (http://www.bioportal.uio.no) e Cipres Portal (http://www.phylo.org/sub sections/portal).

Como estimativa de suporte dos clados obtidos nas análises filogenéticas, foram considerados suportes elevados valores de *bootstrap* acima de 70% para a MP e MV e acima de 95% de probabilidade posterior (PP) na AB. Estes valores, segundo Alfaro *et al.* (2003), equivaleriam aproximadamente a 95% de acurácia (probabilidade de um dado grupo monofilético ser verdadeiro), mas devem ser interpretados com cautela, pois, já foi demonstrado que valores de *bootstrap* acima de 70% e PP acima de 95% também podem ser recuperados para grupos que não são realmente monofiléticos.

Tabela 8. Modelos evolutivos selecionados para cada partição (acrônimos seguindo o Modeltest 3.7). Destacados em negrito, os modelos utilizados nas análises filogenéticas.

Partição	AICc
cyt <i>b</i> total	GTR+I+G
cyt <i>b</i> posição 1 no códon	K80+G
cyt <i>b</i> posição 2 no códon	HKY+G
cyt <i>b</i> posição 3 no códon	GTR+I+G
ND4 total	GTR+I+G
ND4 posição 1 no códon	GTR+I+G
ND4 posição 2 no códon	HKY+G
ND4 posição 3 no códon	HKY+G
cyt b + ND4 total	GTR+I+G
cyt <i>b</i> + ND4 posição 1 no códon	HKY+I+G
cyt <i>b</i> + ND4 posição 2 no códon	GTR+I+G
cyt <i>b</i> + ND4 posição 3 no códon	GTR+I+G

Tabela 9. Teste para verificação do melhor tipo de particionamento: número de pares de base (n), número de parâmetros (k), valores de máxima verossimilhança (MV), AIC, e AICc. O valor mais baixo de AICc, que determinou o sistema de particionamento a ser utilizado, está destacado em negrito.

Partição	n	k	MV	AIC	AICc
Sem partição	1018	257	-4723,06	9960,114	10134,603
Por gene	1018	268	-4716,61	9969,226	10161,728
Por códon	1018	275	-4505,55	9561,100	9765,682
Por gene/códon	1018	289	-4505,31	9588,618	9818,865

4. RESULTADOS

Foram obtidas sequências de fragmentos com 378 pb do gene cyt *b* para 130 exemplares de *Bothrops* (Tabela 5). O alinhamento apresentou 134 sítios variáveis, sendo 98 informativos (Tabela 10). Para o ND4, foram obtidos 640 pb para 116 exemplares (Tabela 5). Foram constatados 211 sítios variáveis, dos quais 165 mostraram-se informativos (Tabela 10).

As comparações das sequências obtidas com as disponíveis no GenBank não apresentaram sinais de que os fragmentos fossem parálogos aos genes de interesse (sem mudança do quadro de leitura, sem mudanças relativamente excessivas de aminoácidos e ausência de códons de parada antes do esperado).

Foram detectados 41 espécimes com sequências idênticas para os dois genes, distribuídas em 17 haplótipos (Tabela 11). Dessa forma, 24 sequências foram retiradas da Matriz 1, para a composição da Matriz 2, que foi utilizada nas análises filogenéticas.

Tabela 10. Relação dos genes analisados, proporções de sítios invariáveis, variáveis e parcimônia-informativos dos genes cyt *b* e ND4, e número total de sequências obtidas de exemplares do gênero *Bothrops*.

	cyt <i>b</i> (378 pb)	ND4 (640 pb)
Sítios invariáveis	244	429
Sítios variáveis	134	211
Sítios informativos	98	165
Número de sequências	130	116

Haplótipos	Espécie	Espécimes (código/localidade de procedência)
1	B. diporus	TM65, Itaipu (PR) = TM198, Passo Fundo (RS)
2	B. diporus	TM44, Constantina (RS) = TM66, Itaipu (PR)
3	B. diporus	TM16, Blumenau (SC) = TM215, Tuparendi (RS) = TM217, Três Passos (RS)
4	B. erythromelas	TM58, Alagoado (BA) = TM95, Petrolândia (PE)
5	B. marmoratus	TM87, Lajeado (TO) = TM88, Lajeado (TO)
	(a) <i>B. marmoratus/pauloensis,</i>	
6	(b) <i>B. pauloensis</i> , (c) <i>B. marmoratus</i>	(a) TM127, Aporé (GO) = (b) TM120, Goiânia (GO) = (c) TM126, Orizona (GO)
7	B. neuwiedi	TM78, Andradas (MG) = TM84, Machado (MG)
8	B. neuwiedi	TM30, Baependi (MG) = TM31, Baependi (MG)
9	B. neuwiedi	TM63, São Miguel Arcanjo (SP) = IB55555, Angatuba (SP)
10	B. neuwiedi	TM15, Santo André (SP) = TM05/TM33, São Vicente de Minas (MG)
11	B. neuwiedi	TM23/TM42/TM70, Itu (SP) = TM41/TM76, Munhoz (MG) = TM19, Votorantim (SP)
12	B. neuwiedi	TM89, Congonhas (MG) = TM136, Ouro Branco (MG)
13	B. pauloensis	TM128, Aporé (GO) = TM125, Silvânia (GO)
14	B. pauloensis	TM86, Araguari (MG) = TM37, Frutal (MG)
15	B. pauloensis	TM85, Frutal (MG) = TM21, Prata (MG)
16	B. pubescens	TM199, Bagé (RS) = TM201, São Leopoldo (RS)
17	B. pubescens	TM193, Barra do Ribeiro (RS) = TM205, Gravataí (RS)

 Tabela 11. Relação das sequências idênticas para os genes cyt b e ND4 obtidas neste trabalho para 41 espécimes do gênero Bothrops.

4.1. Reconstruções filogenéticas

As análises iniciais realizadas com o grupo externo mais amplo (composto por 42 sequências dos gêneros *Bothrops*, *Bothriopsis* e *Bothrocophias*) recuperaram o monofiletismo do grupo *neuwiedi* (clado A) com *bootstrap* de 100% em MP e MV e probabilidade posterior igual a 100% na AB (dados não apresentados). Nas análises subsequentes, o grupo externo foi reduzido a espécies do grupo *jararaca* (*Bothrops jararaca* e *Bothrops insularis*), grupo irmão de *neuwiedi*.

As topologias das árvores obtidas foram similares nas três análises realizadas (MP, MV e AB), de modo que na Figura 19 é apresentada a topologia consenso de 70% das árvores obtidas pela AB. Os valores de suporte obtidos por *bootstrap* em MP e MV, e probabilidade posterior (PP) na AB estão indicados na Figura 19, obedecendo esta ordem: MP/MV/AB; em ramos sem suporte elevado (*bootstrap* inferior a 70% para MP e MV e probabilidade posterior inferior a 95%), os valores são representado por traço (-).

Para a análise de MP foram encontradas 386 árvores igualmente parcimoniosas com o comprimento de 568 passos.

Nas Figuras 19 e 20, as oito espécies atualmente reconhecidas para o grupo *neuwiedi* foram destacadas com cores diferentes: *B. erythromelas* (vermelha), *B. lutzi* (verde-claro), *B. neuwiedi* (rosa), *B. marmoratus* (verde-escuro), *B. pauloensis* (azul-claro), *B. mattogrossensis* (laranja), *B. diporus* (azul-escuro) e *B. pubescens* (cinza).

Foram observadas nove linhagens (C, D, L, M, I, J, N, R e S) dentro do grupo *neuwiedi* (Figuras 19 e 21). Seis destas linhagens tiveram suportes acima de 70% de *bootstrap* em MP/MV e PP acima de 95% em AB (C, D, L, M, J e N), duas (I e R) foram recuperadas somente nas análises de MV/AB, e a linhagem S apresentou suporte elevado apenas na AB (S). As nove linhagens recuperadas, com as respectivas espécies e valores de suporte obtidos por MP/MV/AB, são:

- clado C: *B. erythromelas* (99/99/100)

- clado D: *B. lutzi* e *Bothrops* sp. (93/89/100)

- clado L: *B. neuwiedi* (98/100/100)

- clado M: B. marmoratus, B. pauloensis, B. marmoratus/pauloensis e B. neuwiedi (87/96/100)

- clado I: *B. neuwiedi*, *B. pauloensis* e *B. neuwiedi/pauloensis* (64/78/100)

- clado J: B. mattogrossensis, B. marmoratus, B. pauloensis e B. mattogrossensis/marmoratus (99/95/100)

- clado N: B. pauloensis e B. marmoratus (96/98/100)

- clado R: *B. diporus* (-/73/99)

- clado S: *B. pubescens* (-/-/95).

A relação entre as linhagens C e D, e entre elas e as demais linhagens não estão resolvidas, o que pode ser constatado devido aos baixos suportes dos nós B e E, destacados com asterisco (*) na Figura 19. As outras linhagens foram recuperadas em dois clados mais inclusivos, os clados F e G. O clado F, que inclui as linhagens L, M e I, foi recuperado com suportes elevados na MP e AB; as linhagens L e M formam um grupo monofilético com suportes elevados nas três análises (clado H) (Figuras 19). O clado G, formado pelas linhagens J, N, R e S, foi recuperado apenas nas análises de MV e AB; o clado J é grupo irmão das demais linhagens agrupadas no clado K, que foi recuperado com suportes elevados nas três análises (Figuras 19). O clado O, grupo monofilético formado pelas linhagens R e S, apresentou suportes elevados apenas na AB. Os valores de suporte recuperados em MP, MV e AB, para os ramos internos do grupo *neuwiedi* são:

- clado B, inclui os clados C e D, (-/-/65)

- clado H, inclui os clados L e M (87/97/100)

- clado F, inclui os clados H e I (98/-/100)

- clado K, inclui os clados N e O/TM173/PT3404 (93/72/100)

- clado G, inclui os clados J e K (59/97/100)

- clado O, inclui os clados R e S (31/-/96)

- clado E, inclui os clados F e G (41/-/92).

Foram recuperadas politomias nos clados: A (que inclui as linhagens C, D, F e G), K (que inclui N, R, S e os espécimes TM173 e PT3404) e em cada clado correspondente as nove linhagens destacadas anteriormente

As análises revelaram que apenas três espécies - definidas de acordo com a morfologia - foram recuperadas como monofiléticas: *B. erythromelas* (clado C), *B. lutzi* (clado D) e *B. pubescens* (clado S); as demais espécies apresentaram parafiletismo ou polifiletismo: *B. neuwiedi* (clados L, M e I), *B. marmoratus* (clados M, J e N), *B. pauloensis* (clados M, I, J e N), *B. mattogrossensis* (clados J e K) e *B. diporus* (clados R e K) (Figuras 19).

Os exemplares de *B. erythromelas* (clado C) ficaram divididos em dois subclados, com altos valores de suporte: um formado por exemplares de duas localidades mais ao sul da Bahia (Guanambi e Ibitira) e o outro pelo agrupamento de indivíduos das localidades mais ao norte da Bahia (Santo Inácio e Alagoado), de Petrolândia em Pernambuco e Piranhas em Alagoas (Figuras 19 e 21).

No clado D, que inclui os espécimes de *B. lutzi*, o exemplar de Uruçuí-Una (PI) é grupo irmão de dois subclados. Um deles apresentou dois espécimes da Estação Ecológica Serra Geral de Tocantins (EESGT) e o outro, os espécimes de Ibiraba e Jaborandi (BA), EESGT (TO) e Piracicaba (SP) (Figuras 19 e 21). A identificação com base na morfologia externa do exemplar de Piracicaba (SP) necessitaria de confirmação, porém, é provável que o *voucher* tenha sido perdido no recente incêndio da Coleção Herpetológica do Instituto Butantan (Escobar, 2010).

A espécie *B. pubescens* foi recuperada como um grupo monofilético (clado S) com suporte elevado apenas na AB. Os exemplares foram recuperados em dois subclados: o subclado P agrupou os espécimes de Cachoeira do Sul, Camaquã, Canguçu e Pelotas (RS), e o subclado Q incluiu exemplares de Barra do Ribeiro, Barão do Triunfo, Chuvisca, Eldorado do Sul, Bagé, Porto Alegre e Viamão (RS) (Figura 19 e 21).

Exemplares de *B. neuwiedi* foram recuperados em três diferentes clados (L, M e I). Uma linhagem exclusiva de *B. neuwiedi* foi recuperada no clado L, dividida em dois subclados: um agrupamento incluiu os espécimes de Congonhas, Ouro Branco, Itabirito e Mariana (MG), e o outro foi composto pelos exemplares de Diamantina, São Gonçalo do Rio Preto, Mariana (MG) e Ibiúna (SP) (Figuras 19 e 21). Apenas um espécime de *B. neuwiedi*, procedente de Ouro Branco (MG), foi recuperado no clado M. No clado I, exemplares de *B. neuwiedi* de 23 localidades dos Estados de Minas Gerais, São Paulo e Paraná apareceram mais relacionados a *B. pauloensis* de Analândia, Itirapina, Motuca e São Manuel no Estado de São Paulo; o clado não mostrou estruturação interna, isto é, os suportes apresentaram valores inferiores a 70% para o *bootstrap* na MP e MV, e menores que 95% de PP na AB (Figura 19 e 21). Os morfotipos intermediários entre *B. neuwiedi* e *B. pauloensis* procedentes de Pardinho (TM74) e Patrocínio Paulista (TM75) (SP) também foram recuperados neste agrupamento.

Exemplares de *B. pauloensis* foram recuperados em quatro clados distintos (M, I, J e N). No clado M, um espécime de *B. pauloensis* procedente de Goiânia (TM

120) e dois exemplares considerados intermediários morfológicos entre *B. pauloensis* e *B. marmoratus* de Aporé (TM127) e Hidrolândia (TM119) constituíram um agrupamento com exemplares de *B. marmoratus* (Figura 19 e 21). No clado I, os indivíduos procedentes do Estado de São Paulo (Analândia, Itirapina, Motuca e São Manuel) agruparam com *B. neuwiedi* (Figura 19 e 21). No clado J, o espécime de *B. pauloensis* (TM115) de Jataí (GO) foi recuperado como grupo irmão do morfotipo intermediário entre *B. marmoratus* e *B. mattogrossensis* (TM130) de Caiapônia (GO); os exemplares de UHE Peixe (TO) foram agrupados com *B. marmoratus* de Minaçu (GO) e Lajeado (TO); e os exemplares de APM Manso (MT) formam um clado com indivíduos de *B. mattogrossensis* de Cuiabá e Chapada dos Guimarães (MT) (Figuras 19 e 21). No clado N, foram agrupados os espécimes de *B. pauloensis* do Parque Nacional das Emas (GO), Frutal, Araguari e Prata (MG), e um agrupamento formado pelos exemplares de *B. pauloensis* provenientes de Aporé, Silvânia, Jataí, Goiânia e Serranópolis (GO) e espécimes de *B. marmoratus* (Jataí e Luziânia - GO) (Figura 19 e 20).

Todos os espécimes de *B. mattogrossensis* foram recuperados no clado J, com exceção do TM173, proveniente de Serra da Borda, que foi recuperado no clado K. No clado J, o espécime de Caiapônia, indivíduo intermediário entre *B. mattogrossensis* e *B. marmoratus* (TM130), e *B. pauloensis* de Jataí (GO) foram recuperados como grupo irmão de dois subclados: um formado exclusivamente por exemplares de *B. mattogrossensis* de Cuiabá, Jauru, Chapada dos Guimarães (MT) e Aquidauana (MS), e outro que se subdivide em outros dois grupos, um dos quais reuniu espécimes de *B. mattogrossensis* de Cuiabá e da Chapada dos Guimarães, e *B. pauloensis* de APM Manso (MT), e o outro que incluiu três exemplares de *B. matmoratus* (GO) e Lajeado (TO) e os exemplares de *B. pauloensis* de UHE Peixe (TO) (Figura 19 e 21).

A espécie *B. marmoratus* foi encontrada em três clados (M, J e N). O clado M incluiu o exemplar da Reserva Ecológica do IBGE – RECOR (DF) e *B. neuwiedi* de Ouro Branco (MG), grupo irmão de dois subclados: um agrupamento com os exemplares de Serra da Canastra e Serra do Salitre (MG) e o outro reunindo os espécimes de quatro localidades do Estado de Goiás: Orizona, Goiânia, Hidrolândia e Leopoldo de Bulhões. Neste subclado, também foram incluídos o exemplar de *B. pauloensis* de Goiânia (GO) (TM120) e os espécimes com características morfológicas intermediárias entre *B. pauloensis* e *B. marmoratus* de Aporé (TM127)

e Hidrolândia (TM119) (Figuras 19 e 21). Adicionalmente, no clado J, foram agrupados o espécime intermediário *B. marmoratus/mattogrossensis* (TM130) de Caiapônia (GO) e os espécimes de Minaçu (GO) e Lajeado (TO), que fomaram um subclado com exemplares de *B. pauloensis* da UHE Peixe (TO), e no clado N, os exemplares de *B. marmoratus* de Jataí e Luziânia (GO) foram reunidos com exemplares de *B. pauloensis* (Figura 19 e 21).

Os espécimes provenientes do Brasil de *B. diporus* formaram um grupo monofilético (clado R), que inclui, sem estruturação interna, espécimes das localidades de Blumenau (SC), Itaipu (PR), Chiapeta, Constantina, Três Passos, Tuparendi, Passo Fundo, Tucunduva, Jóia e Santiago (RS). O exemplar proveniente da Argentina não agrupou com os demais, resultando na politomia observada no clado K (Figuras 19 e 21).

4.2. Distâncias genéticas

Foram calculadas as distâncias genéticas interespecíficas e intraespecíficas dos espécimes amostrados, a partir da distância corrigida do cyt *b* (Matriz 3), para cada uma das linhagens recuperadas nas análises (Anexo 2).

As distâncias genéticas mínimas e máximas do grupo *neuwiedi* em relação aos gêneros *Porthidium*, *Bothrocophias* e *Bothriopsis* foram, respectivamente, de 17,1% a 21,8%; de 11,9% a 15,3%; e de 7,6% a 12,4%; para os grupos *atrox*, *alternatus* e *jararaca* os valores variaram, respectivamente, de 11,1% a 16,1%; de 9,8% a 13,1%; e de 6,5% a 11,7%.

Dentro do grupo *neuwiedi*, as menores distâncias genéticas foram encontradas entre as linhagens R – S e L - M. As linhagens R (distância intraespecífica entre 0 e 2,4%) e S (0 a 1%) apresentam diferenças de 0,9% a 2,7% entre si. A linhagem N (0 a 1,3%) divergiu das linhagens R e S em 2,1% a 4,3 As distâncias do clado K (N, R e S) em relação ao seu grupo irmão (clado J), variaram de 4,7% a 8,5%, e em relação aos demais clados, de 5,2% a 10,7%. Os clados L (0 a 1%) e M (0 a 0,5%), grupos irmãos, apresentaram distâncias genéticas entre 1,6% e 1,8%, e 3,2% a 5,3% em relação ao seu grupo irmão, o clado I. As três linhagens do clado F (L, M e I) apresentam distâncias genéticas entre 4,7% a 10,7% em relação aos demais clados.

O clado C apresentou a maior distância intraespecífica, 0 a 3,5%. Em relação aos demais clados do grupo, *neuwiedi* apresentou distâncias entre 6,3% e 9,5%,

exceto pelo clado D que possuiu distâncias mais baixas (4,9% a 6,7%). O clado D, cuja distância interna variou de 0 a 2,4%, apresentou distâcias genéticas de no mínimo 4,4% e no máximo 7,8% com relação aos demais clados.

Como exceção, foram observadas divergências relativamente elevadas entre os subclados do clado J, que variou entre 1,4% a 2,4%, e de alguns exemplares em relação aos seus clados: TM206 de Tucunduva e TM209 de Santiago (RS) no clado R (1,8 % a 2,4%), TM60 de Urucuí-Una (PI) no clado D (1,6% a 2,4%) e TM02 de Ibitira (BA) no clado C (2,9% a 3,5%).

O exemplar de *B. diporus* (PT3404) apresentou distâncias entre 2,3% a 4,1% com relação ao clado R, que agrupa os demais espécimes de *B. diporus*, e o exemplar TM173 de *B. mattogrossensis* diferiu de 5,9% a 7,0% em relação aos exemplares de mesma espécie do clado J.

Os haplótipos distintos na mesma localidade apresentaram as seguintes distâncias genéticas: *B. neuwiedi* (TM136 e TM142) de Ouro Branco (MG) nos clados L e M = 1,6%; *B. neuwiedi* (TM14 e TM07) de São Gonçalo do Rio Preto (MG) nos clados L e I = 3,8%, *B. pauloensis* (TM124 e TM120) de Goiânia (GO) nos clados M e N = 6,7%, *B. pauloensis* (TM112 e TM115) de Jataí (GO) nos clados N e J = 6,1%.



Figura 19. Topologia obtida na análise bayesiana (AB) a partir de 1018 pb de fragmentos dos genes mitocondriais cit *b* e ND4. Somente os valores de *bootstrap* superiores a 70% em máxima parcimônia (MP) e máxima verossimilhança (MV) e de probabilidade posterior superior a 95% em AB respectivamente são apresentados, os valores inferiores estão representados nos ramos pelo sinal (-). Os asteriscos (*) indicam os ramos internos com valor de *bootstrap* < 70% em MP/MV e probabilidade posterior < 95% em AB. Cada cor é correspondente a uma das oito espécies do grupo *neuwiedi,* classificadas de acordo com a morfologia (Silva, 2000, 2004; Silva & Rodrigues, 2008). A cor preta representa o único exemplar que não teve a morfologia confirmada.



Figura 20. Mapa com a delimitação dos biomas brasileiros (AM = Amazônia, CE = Cerrado, PA = Pantanal, CA = Caatinga, MA = Mata Atlântica e CM = Campos), indicando as localidades amostradas. Cada cor é correspondente a uma das oito espécies do grupo *neuwiedi*, classificadas de acordo com a morfologia (Silva, 2000, 2004; Silva & Rodrigues, 2008). A cor preta representa a localidade que teve a morfologia do exemplar não confirmada. Na localidade **1** (Jataí, GO) ocorreu simpatria de *B. marmoratus* e *B. pauloensis*; em **2** (Goiânia, GO), simpatria de *B. marmoratus* e *B. pauloensis*; em **3** (Aporé, GO), simpatria de *B. marmoratus/pauloensis* e *B. pauloensis*; em **4** (Hidrolândia, GO), simpatria de *B. marmoratus*.



Figura 21. Distribuição geográfica dos clados obtidos nas análises moleculares. Divisão do território brasileiro por biomas: AM = Amazônia, CE = Cerrado, PA = Pantanal, CA = Caatinga, MA = Mata Atlântica e CM = Campos. Na localidade **1** (Jataí, GO) ocorreu simpatria de *B. marmoratus* e *B. pauloensis*; em **2** (Goiânia, GO), simpatria de *B. marmoratus* e *B. pauloensis*; em **3** (Aporé, GO), simpatria de *B. marmoratus/pauloensis* e *B. pauloensis*; em **4** (Hidrolândia, GO), simpatria de *B. marmoratus/pauloensis* e *B. marmoratus*.

- Clado C (B. erythromelas)
- ---- Clado D (*B. lutzi* e *Bothrops* sp.)
- Clado L (B. neuwiedi)
- Clado M (B. marmoratus, B. pauloensis e B. marmoratus/pauloensis)
- Clado N (B. pauloensis e B. marmoratus)
- Clado J (B. mattogrossensis, B. mattogrossensis/marmoratus, B. marmoratus e B. pauloensis)
- Clado I (B. neuwiedi, B. pauloensis e B. neuwiedi/pauloensis)
- Clado R (*B. diporus*)
- Clado S (*B. pubescens*)

5. DISCUSSÃO

Este trabalho apresenta a primeira hipótese de relações filogenéticas que inclui todas as espécies de *Bothrops* do grupo *neuwiedi*.

As análises foram realizadas utilizando sequências parciais dos genes mitocondriais citocromo *b* e ND4, totalizando 1018 pb para 140 espécimes pertencentes ao grupo, todas geradas neste trabalho.

Os dados obtidos fornecem um aumento quantitativo e qualitativo das informações disponíveis na literatura, uma vez que, até o presente, nenhum estudo realizado incluiu todas as espécies consideradas atualmente para o grupo ou uma amostragem tão ampla quanto a utilizada neste trabalho. São apresentadas as primeiras informações das espécies *B. lutzi*, *B. mattogrossensis* e *B. pubescens* em uma filogenia molecular obtida para o grupo *neuwiedi*.

Os resultados representam novas informações a serem consideradas em conjunto com os dados morfológicos e de distribuição geográfica e possibilitam uma nova visão sobre a complexidade das espécies e dos processos envolvidos na história evolutiva do grupo.

- Contribuições para o entendimento das espécies do grupo neuwiedi

As análises moleculares aqui apresentadas estão de acordo com o seguinte aspecto previamente descrito na literatura: o grupo *jararaca* se mostrou grupo irmão do grupo *neuwiedi* (Parkinson, 1999; Gutberlet & Campbell, 2001; Wüster *et al.*, 2002; Castoe & Parkinson, 2006; Fenwick *et al.*, 2009).

Com relação à análise mais completa até então realizada para o grupo *neuwiedi* por Fenwick *et al.* (2009), foram aqui acrescentados dados de *B. pubescens*, *B. lutzi* e *B. marmoratus.*

Fenwick *et al.* (2009) recuperaram *B. mattogrossensis* fora do grupo *neuwiedi*, em análise que incluía para esta espécie somente caracteres morfológicos, e, com base em estudos morfológicos prévios, alocaram a espécie no grupo *neuwiedi*. No presente trabalho, o grupo *neuwiedi* foi recuperado como monofilético, com elevados valores de suporte em todas as análises realizadas (MP/MV/AB). São apresentadas nove linhagens principais (C, D, L, M, I, J, N, R e S), também corroboradas por elevados valores de suportes (Figura 19).

O grupo *neuwiedi* (clado A) é uma politomia formada pelo clado C (*B. erythromelas*), D (*B. lutzi* e *Bothrops* sp.), F e G. O clado F é composto pelas

linhagens L (*B*. neuwiedi), М (*B*. marmoratus. В. pauloensis. В. marmoratus/pauloensis e B. neuwiedi), e I (B. neuwiedi, B. pauloensis e B. neuwiedi/pauloensis). O clado G é composto pelas linhagens J (B. mattogrossensis, B. marmoratus, B. pauloensis e B. mattogrossensis/marmoratus), N (B. pauloensis e B. marmoratus), R (B. diporus), e S (B. pubescens). Os clados F e G, são agrupamentos que ocupam, respectivamente, a região leste/centro-oeste e a região centro-oeste/sul, e se conectam na região central do Brasil no Estado de Goiás pelos clados M e N.

Bothrops erythromelas, B. lutzi (incluindo Bothrops sp.) e B. pubescens, respectivamente linhagens C, D e S, são recuperadas como grupos monofiléticos. Bothrops diporus, B. mattogrossensis, B. neuwiedi, B. marmoratus e B. pauloensis não se mostraram reciprocamente monofiléticas, com haplótipos recuperados em diferentes clados: B. diporus em R e K; B. mattogrossensis em J e K; B. neuwiedi em M, L e I; B. marmoratus em M, N e J; e B. pauloensis em M, I, J e N.

A análise filogenética molecular do presente estudo indica a insuficiência e ineficiência de análises de similaridade geral da morfologia como critério diagnóstico destas espécies. O problema foi verificado tanto nas espécies de fácil distinção, como *B. diporus*, *B. mattogrossensis*, *B. neuwiedi* e *B. pauloensis*, como também em espécies eventualmente difíceis de separar (*B. marmoratus* e *B. pauloensis*), demonstrando a necessidade premente de uma reavaliação utilizando o conjunto de dados aqui apresentados, uma vez que a taxonomia puramente fenética mostrou-se inconsistente com as relações de parentesco obtidas a partir do DNA mitocondrial.

Muitas podem ser as causas das incongruências observadas entre os resultados da presente análise de DNA mitocondrial e o arranjo taxonômico corrente (Silva, 2000, 2004; Silva & Rodrigues, 2008). A princípio, um fator importante a ser considerado neste caso refere-se não ao tipo ou qualidade da evidência comparativa (morfologia *versus* molecular), mas ao emprego de metodologias díspares de análise, no caso caracterização de linhagens baseada em métodos fenéticos, em contraposição à caracterização de linhagens baseada em métodos cladísticos. O arranjo taxonômico corrente foi baseado em dados fenéticos, isto é, construído com base em similaridade geral. A presente análise molecular, ao contrário, não impõe restrições apriorísticas quanto às unidades taxonômicas, sendo a delimitação depende inteiramente da interpretação dos resultados da análise filogenética. Dessa forma, pode-se considerar como não adequada a comparação entre os resultados das duas abordagens. Avaliar exatamente qual dos problemas possíveis é a principal causa da incompatibilidade observada neste caso em particular requer uma nova análise dos dados morfológicos, empregando uma metodologia filogenética apropriada (disponível atualmente, como, por exemplo, o TNT, que permite tratar cada exemplar como unidade taxonômica operacional). Somente dessa forma as incongruências restantes necessitariam de uma explicação biológica adicional, por meio da invocação de processos particulares atuantes na evolução dos caracteres (Brower *et al.*, 1996), tanto morfológicos quanto moleculares (revisados brevemente a seguir).

Entre estes, as discordâncias encontradas também poderiam ser uma consequência do estado polimórfico mantido nas populações, em função da plasticidade fenotípica, que tem desenvolvido um importante papel na evolução adaptativa das espécies, permitindo às populações utilizarem recursos distintos e ocuparem novos hábitats (West-Eberhard, 1989; Losos, 2001). Segundo Leimar (2005), o polimorfismo em populações poderia ser aleatoriamente fixado durante o desenvolvimento, ter determinação genética ou influência ambiental.

Considerando que a classificação atual do grupo *neuwiedi* é baseada principalmente em padrões de manchas e coloração, a ocorrência dos respectivos padrões de *B. neuwiedi* e *B. pauloensis* em linhagens diferentes poderia ser explicada por retenção de morfologia ancestral. Em contraposição, os padrões de *B. marmoratus* e de *B. pauloensis*, ambos de difícil distinção (em especial nos exemplares melânicos), sugerem a ocorrência do fenômeno de convergência. Ambos os casos apresentam o mesmo padrão em filogenias, e podem ocorrer em resposta a pressões seletivas similares (Funk & Omland, 2003). Nestes casos, os resultados moleculares com padrão parafilético e polifilético evidenciariam a existência de espécies crípticas, e por conseqüência, linhagens candidatas a novas espécies, como, por exemplo, ressaltado por Fouquet *et al.* (2007) para anuros da subfamília Hylinae.

Organismos que estão sob condições ambientais extremas estão sujeitos a seleção estabilizadora e submetidos à redução ou eliminação de mudanças morfológicas, que poderiam acompanhar a especiação (Bickford *et al.*, 2007).

A favor da hipótese de seleção estabilizadora, que explicaria o padrão não monofilético de várias espécies do grupo *neuwiedi*, existem estudos sobre a
importância do padrão de manchas e coloração em serpentes em diversos hábitats (Bechtel, 1978; Brodie, 1993; Wüster *et al.*, 2004).

Alguns padrões de manchas e colorações em serpentes peçonhentas, quando contrastantes, possuem a função de alertar os predadores; outros servem para camuflagem nos ambientes. Ambos os padrões podem ser imitados por animais não peçonhentos e propiciar menos ataques de predadores (Brodie, 1993; Wüster *et al.*, 2004). A variação dos padrões pode ser individual, regional, ontogenética ou sexual, mas existem alguns padrões que são recorrentes nas diferentes espécies (Bechtel, 1978). Exemplo disso pode ser observado na presença de faixas escuras ao redor dos olhos ou que se prolongam dos olhos ao ângulo da mandíbula, cuja função é proteger os olhos da luz solar e/ou torná-los menos conspícuos às presas (Bechtel, 1978).

O melanismo é outro exemplo de padrão recorrente, tanto em serpentes como nos demais vertebrados, e pode ser consequência da idade, proteção para animais que vivem em ambientes com alta incidência de raios solares ou auxiliar na termorregulação em regiões mais frias (Bechtel, 1978; Hoekstra, 2006).

Atualmente, são conhecidos poucos genes que estão diretamente relacionados à variação no padrão de cor e pigmentação (Hoekstra, 2006). O gene Mc1r (receptor de melanocortina -1), parte de uma grande família gênica envolvida no controle do padrão de pigmentação e homeostase energética, é um exemplo cujas mutações são responsáveis por vários casos de melanismo em roedores, organismos-modelos para o estudo de mecanismos que contribuem para a variação regional, tipo e densidade de melanina em vertebrados (Hoekstra, 2006). Acredita-se que este possa ser um dos genes envolvidos no exemplo de evolução independente de fenótipos similares, que ocorre nos lagartos de White Sands no Novo México (Hoekstra, 2006; Rosemblum, 2006). Lagartos que habitam a região de solo escuro, areia branca e transição entre os dois ambientes apresentam perda gradual de melanina (Rosemblum, 2006). Os resultados sustentam a relação prevista entre a coloração dorsal dos animais e do substrato, e as populações com respostas fenotípicas mais extremas também apresentaram um grau maior de divergência genética. Rosemblum (2006) destaca a importância dos fatores ecológicos na formação de padrões fenotípicos e sugere que a seleção teria sido responsável pela coloração similar na guilda de lagartos estudada.

Relações filogenéticas recuperadas para vários grupos, por meio das análises moleculares, têm sido discordantes com as obtidas em análises morfológicas, que, em geral, tendem a ser conservativas e a subestimar a diversidade das linhagens em diversos níveis (Pellegrino *et al.*, 2005; Fouquet *et al.*, 2007; Geurgas *et al.*, 2008; Kelly *et al.*, 2008; Daza *et al.*, 2009; Hedges *et al.*, 2009; Metzger *et al.*, 2009; Vidal *et al.*, 2009; Zaher *et al.*, 2009; Vallinoto *et al.*, 2010).

Por outro lado, apesar de fundamentais em estudos interdisciplinares, as abordagens moleculares isoladamente nem sempre refletem a história das espécies e estão influenciadas pela escolha particular de uma região genômica (Avise, 2004; Degnan & Rosenberg, 2006). Dessa forma, são necessárias atenção e cautela na interpretação dos dados quando uma reconstrução filogenética é realizada com base em um único gene.

Embora este trabalho seja baseado em dois genes (cyt *b* e ND4), esta crítica poderia ser aplicada pelo fato de estas sequências serem exclusivamente mitocondriais, e atuarem como um único *locus* gênico (Maddison, 1997; Nichols, 2001). É importante, porém, ressaltar que os dados aqui apresentados foram analisados associando os dados das filogenias aos dados de distribuição geográfica e distância genética para o grupo *neuwiedi*.

Em nossos resultados, as espécies monofiléticas demonstram isolamento geográfico das demais espécies, enquanto as polifiléticas - *B. mattogrossensis*, *B. neuwiedi*, *B. marmoratus* e *B. pauloensis* - apresentam distribuição geográfica sobreposta, ocorrência de simpatria e compartilhamento de haplótipos (Figura 21). A única exceção foi *B. diporus* que, apesar de parafilética, mostrou-se isolada geograficamente.

As espécies isoladas geograficamente estão dispostas nos extremos da distribuição do grupo *neuwiedi* no Brasil: região nordeste - norte (*B. erythromelas* e *B. lutzi*) e região sul (*B. pubescens* e *B. diporus*). As demais, que ocorrem nos clados L, M, I, J e N, apresentam distribuição intermediária no território brasileiro, principalmente na região do Cerrado, um dos biomas com os maiores índices de endemismo e mais ameaçados no planeta.

No que concerne às distâncias genéticas entre os clados, foram recuperados valores elevados, assim como para os exemplares da mesma espécie que ocorrem nos diferentes clados. Alguns trabalhos em viperídeos mostraram divergência genética para o cyt *b* de 4,3%, 5,7% e 6,1% entre *B. caribbaeus* e *B. lanceolatus*,

grupo *atrox* e grupo *asper*, respectivamente (Wüster *et al.*, 2002). Parkinson *et al.* (2002) encontraram distâncias genéticas de 4% a 6,4% entre as espécies do gênero *Agkistrodon*. Fenwick *et al.* (2009) encontraram para o grupo *jararaca* + grupo *neuwiedi* (*Bothropoides*) divergência interna média de 9%; e, em relação ao grupo *atrox*, 14,8%, ao grupo *alternatus*, 11,4%, a *Bothriopsis*, 14,6%, a *Bothrocophias*, 15,5% e a *Porthidium*, 24,5%.

Os resultados obtidos para os clados do grupo *neuwiedi* possuem a mesma ordem de grandeza dos valores encontrados na literatura, também similares àqueles encontrados para outros gêneros de serpentes (1,6% a 6,2%) (Kraus *et al.*, 1996; Ashton & de Queiroz, 2001; Keogh *et al.*, 2001; Wüster *et al.*, 2002b; Parkinson *et al.*, 2002; Rawlings & Donnellan, 2003; Sanders *et al.*, 2006; Fenwick *et al.*, 2009). Portanto, os resultados de distância genética sustentam a hipótese de que cada uma das nove linhagens principais poderia ser considerada uma espécie.

Nagy *et al.* (2007), no entanto, alertam para o problema de se admitir limiares de divergência genética baixos para a delimitação de espécies. Em sepentes do gênero *Madagascarophis*, colubrídeo endêmico da Ilha de Madagascar, o DNA mitocondrial recuperou seis clados com divergências entre si de 4,8% a 7,1% e também apresentou altos valores de divergência para haplótipos de mesma localidade compartilhados entre os clados (5,0% a 5,2%), porém a análise do DNA nuclear recuperou apenas três clados. A solução taxonômica proposta foi a delimitação de apenas três espécies; sendo uma delas composta por quatro linhagens de DNA mitocondrial, que apresentaram evidências de simpatria e fluxo gênico (Nagy *et al.*, 2007).

No grupo *neuwiedi*, como ressalva, já que o marcador utilizado é exclusivamente mitocondrial, a inclusão de informações nucleares poderiam refinar ainda mais a análise e, nesse caso, cada linhagem poderia não corresponder a uma espécie. A princípio, conforme mencionado anteriormente, as escolhas feitas para esta análise basearam-se em dados da literatura para que houvesse parâmetros de comparação.

A seguir, serão apresentadas as contribuições das análises realizadas neste trabalho, que proporcionarão um ponto de partida para estudos futuros. Novas análises incluindo outros marcadores moleculares, como genes nucleares e/ou microssatélites, estimativas de tempo de divergência, bem como análises populacionais, serão de extrema importância para a melhor caracterização do grupo.

- Bothrops erythromelas

B. erythromelas foi recuperada como um grupo monofilético, geneticamente muito divergente e isolado geograficamente dos demais clados da filogenia (Figuras 19 e 21, Tabela 12). *Bothrops lutzi* foi a espécie mais próxima geneticamente de *B. erythromelas*, mas a relação entre elas ainda não está resolvida.

A amostra de *B. erythromelas* utilizada neste trabalho foi coletada em localidades ao longo do submédio e médio Rio São Francisco (Figura 21). Ibitira e Santo Inácio (BA) pertencem à região das dunas interiores na margem direita do Rio e Alagoado (BA), à margem esquerda. Piranhas (AL) e Petrolândia (PE) possuem vegetação típica de Caatinga, enquanto Guanambi (BA) situa-se em uma área transicional de Caatinga para Mata, com Cerrado nas regiões de altitude. Na Figura 19, os dois subclados observados não correspondem à barreira formada pelas margens do Rio, mas a um padrão de diferenciação a montante e a jusante da região central do médio São Francisco.

B. erythromelas foi descrita por Amaral (1923), e o holótipo é proveniente de Jaguarari no Estado da Bahia (Amaral, 1926). Pouco é conhecido sobre os hábitos da espécie, que possui características distintas dos outros componentes do grupo *neuwiedi*, como o tamanho relativamente menor e a coloração em geral avermelhada com manchas escuras, padrão que originou seu nome (Campbell & Lammar, 2004). Segundo levantamento de herpetofauna realizado por Rodrigues (2003), a espécie foi muito comum e de ampla distribuição na Caatinga.

Nos vários estudos filogenéticos, *B. erythromelas* é recuperada como grupo irmão das demais espécies do grupo *neuwiedi*, e foi utilizada para a polarização dos caracteres na revisão taxonômica realizada para o complexo *neuwiedi* (Parkinson, 1999; Silva, 2000; Gutberlet & Campbell, 2001; Wüster *et al.*, 2002; Castoe & Parkinson, 2006; Fenwick *et al.*, 2009).

A quebra encontrada para *B. erythromelas* no Rio São Francisco é similar à descrita para roedores dos gêneros *Neacomys minutus*, *Oecomys roberti* e *Proechimys kulinae* ao longo Rio Juruá (AM), apresentando uma quebra filogeográfica e dividindo as populações entre as regiões médias superior e inferior (Patton *et al.*, 2000). Os autores sugeriram a existência de uma barreira biogeográfica estável nesta região, uma vez que a quebra foi encontrada em vários táxons.

Um trabalho de ampla amostragem baseado na composição florística do Cerrado atual, descreve a existência de seis províncias fitogeográficas, das quais quatro parecem contribuir para o entendimento de padrões que ocorrem no grupo *neuwiedi* (Ratter *et al.*, 2003; Bridgewater *et al.*, 2004). Na Figura 22 deste trabalho, pode ser observada a sobreposição destas quatro províncias fitogeográficas (PF) obtidas por Ratter *et al.* (2003) e Bridgewater *et al.* (2004), que estão relacionadas com a distribuição da amostra do grupo *neuwiedi*: PF Sul, PF Centro-Sul, PF Centro-Oeste e PF Norte-Nordeste. Similarmente ao exemplo do Rio Juruá, uma quebra foi delimitada na região do médio São Francisco, entre a província fitogeográfica norte-nordeste do Cerrado e a Caatinga, que coincide com a separação dos agrupamentos dentro de *B. erythromelas* (Figura 22).

Uma amostragem mais ampla da espécie, em regiões ao longo do Rio São Francisco e distantes de suas margens, será essencial para a melhor caracterização molecular da espécie e para testar a hipótese de diferenciação da região central em direção à cabeceira e em direção à foz do São Francisco.

- Bothrops lutzi

A segunda espécie recuperada como grupo monofilético neste trabalho foi *B. lutzi*, geneticamente divergente e isolada geograficamente das demais espécies (Figuras 19 e 21, Tabela 12). Os exemplares utilizados são procedentes de localidades com vegetação de Cerrado, exceto Ibiraba (BA) que está localizada em uma região de dunas interiores do Rio São Francisco (Figura 21). Os subclados recuperaram haplótipos da mesma localidade, indício que pode ser interpretado como fluxo gênico (Figura 19). O exemplar TM27 de Piracicaba (SP) tem distribuição disjunta com relação à espécie, que é encontrada na região norte-nordeste do Cerrado (Figura 21).

Bothrops lutzi é uma entidade taxonômica distinta, cuja morfologia é bem definida e os caracteres diagnósticos únicos com relação às demais espécies do grupo (Silva, 2000, 2004; Silva & Rodrigues, 2008). Ocorre no Cerrado, na província fitogeográfica norte-nordeste de Ratter *et al.* (2003) e Bridgewater *et al.* (2004), sendo considerada de ocorrência relictual nos domínios da Caatinga (Silva, 2000, 2004; Rodrigues, 2003; Silva & Rodrigues, 2008). No entanto, recentemente, novos registros para a espécie foram feitos na Caatinga, na Chapada de Ibiapaba, divisa dos Estados do Piauí e Ceará, que parecem estar associados a regiões de transição entre Caatinga e Cerrado (Loebmann, 2009).

A distribuição na Caatinga, geralmente associada às manchas de Cerrado, poderia ser interpretada como um relicto da dinâmica de expansão/retração da Caatinga sobre o Cerrado. Segundo hipótese de Prado & Gibbs (1993) e Pennington *et al.* (2000), durante o Pleistoceno, a floresta tropical seca sazonal (SDTF) teria sofrido expansão sobre áreas que hoje pertencem ao Cerrado e à Amazônia, durante os períodos mais secos, e vice-versa. A Caatinga é considerada um núcleo da SDTF, remanescente de uma formação única e maior que teria existido (*Pleitocene Dry Arc*), diferindo do Cerrado por possui solos mais férteis, com pH básico (Prado & Gibbs, 1993; Pennington *et al.*, 2000; Mayle, 2004).

Toda esta dinâmica durante o Pleistoceno poderia ter contribuído para o isolamento reprodutivo incompleto entre os subclados de *B. lutzi*, e também ter sido responsável por uma distribuição mais ampla da espécie em direção ao sudeste brasileiro, que hipoteticamente, devido a condições ambientais desfavoráveis, posteriormente poderia ter sido restringida a pequenas manchas. Dois fatos corroboram a hipótese de população relictual para a ocorrência de *B. lutzi* na região sudeste, em Piracicaba: 1 - a formação dominante na Folha de Piracicaba já foi Cerradão e manchas de Cerrado *sensu stricto,* cujo histórico de perturbações na área fez com que a vegetação fosse reduzida a pequenas manchas (Rodrigues, 1999); e 2 - três espécimes com o padrão morfológico desta espécie foram registrados em Americana (SP), cidade vizinha de Piracicaba (Silva, 2000, 2004; Silva & Rodrigues, 2008).

Outra explicação para a ocorrência do espécime de *B. lutzi* (TM27) em Piracicaba, embora remota, seria o transporte da sua área de ocorrência nas regiões norte, nordeste e centro-oeste para a região sudeste, na qual foi encontrado. Lamentavelmente, o espécime em questão, que estava extraviado durante o desenvolvimento destas análises, pode ter sido perdido no incêndio ocorrido em 15 de maio de 2010 na Coleção Herpetológica do Instituto Butantan. Embora seja muito remota a hipótese de o exemplar não pertencer a *B. lutzi*, caso isso se confirmasse, a espécie deixaria de ser monofilética.

- Bothrops pubescens

A terceira espécie recuperada como um grupo monofilético foi *B. pubescens* (Figura 19), geograficamente isolada e possui distâncias genéticas elevadas em relação às outras espécies do grupo, exceto quando comparada a *B. diporus* (clado

R), seu grupo irmão (Tabela 12). O clado de *B. pubescens*, composto por exemplares dos pampas gaúchos, apresentou estruturação no eixo norte-sul da distribuição da amostra (Figura 21). A única exceção foi o exemplar de Bagé (RS), localidade no extremo sul da amostra, que foi recuperado no clado norte. Sua presença neste clado poderia ser interpretada como decorrente de retenção de polimorfismo ancestral ou homoplasia molecular (Figura 19).

Os valores de distância genética mais baixos entre *B. pubescens* e *B. diporus* poderiam ser decorrentes da ocupação de regiões mais frias por estas espécies, padrão similar aos obtidos para os organismos das regiões temperadas, cujas taxas de mutação são mais lentas. Outra explicação seria a divergência muito recente entre ambas, como observado por Rawlings & Donnellan (2003) para as serpentes do gênero *Morelia*.

A morfologia de *B. pubescens* é concordante com o monofiletismo do grupo, pois se trata de uma espécie cuja diagnose tem características bem marcantes e distintas, como manchas dorso-laterais do tronco com formato triangular a trapezoidal, manchas na forma de travas na sutura entre as supralabiais e um par de manchas dorso-cefálicas no formato de setas apontando para as laterais da cabeça (Silva, 2000, 2004; Silva & Rodrigues, 2008). Não há variações intraespecífica e geográfica amplas, ou grandes sobreposições de caracteres com as espécies filogeneticamente mais próximas (*B. diporus*, *B. pauloensis* e *B. mattogrossensis*) (Silva, 2000, 2004; Silva & Rodrigues, 2008).

Os estudos de características ecológicas, composição do veneno e de distribuição geográfica também corroboram a hipótese de que *B. pubescens* é uma entidade taxonômica diferente das demais (Silva, 2000; Hartmann *et al.*, 2005; Morais *et al.*, 2006).

Esta linhagem foi recuperada com suporte elevado somente na análise bayesiana, o que pode ser um resultado da maior sensibilidade desta análise ao sinal filogenético. Mesmo com um número relativamente pequeno de caracteres, valores de PP de 95% podem ser recuperados (Alfaro *et al.*, 2003; Cummings *et al.*, 2003; Erixon *et al.*, 2003; Simmons *et al.*, 2004). Por consequência, para a PP, a frequência de rejeição de um grupo monofilético verdadeiro é menor, mas em compensação, a aceitação de um grupo não verdadeiro é maior que nas análises de *bootstrap* (Alfaro *et al.*, 2003). No entanto, vários aspectos corroboram a hipótese de que *B. pubescens*

seria um grupo monofilético verdadeiro, evidenciado neste caso, pela maior sensibilidade desta análise.

- Espécies parafiléticas ou polifiléticas

Algumas fontes de discordâncias para filogenias moleculares são a utilização de genes parálogos e a recombinação gênica. Porém, para o grupo *neuwiedi*, estas hipóteses foram descartadas após todas as possibilidades serem verificadas, tornando-as explicações remotas para justificar o polifiletismo das espécies deste trabalho.

Cada linhagem recuperada apresenta características e história evolutiva distintas, que impedem a elaboração de generalizações, sendo, portanto, necessária a apresentação de cada caso separadamente.

- Bothrops diporus

Entre as espécies com padrão não monofilético, *B. diporus* é a menos complexa deste trabalho, apresentando evidências para a existência de duas linhagens divergentes.

A amostra do território brasileiro foi recuperada como um grupo monofilético, sem estruturação interna, e não incluiu o exemplar (PT3404) de Castro Barros, Argentina. Este exemplar, cuja sequência foi retirada do GenBank, não agrupou com nenhuma das linhagens principais da análise, fazendo parte de uma politomia (clado K). *Bothrops diporus* do Brasil tem elevada distância genética com relação aos demais clados da filogenia, excetuando seu grupo irmão, *B. pubescens*, cuja distância é inferior à apresentada pelos exemplares brasileiros com relação ao espécime PT3404.

Embora não tenha sido detectada diferenciação morfológica entre os exemplares do Brasil e os espécimes com distribuição nos países vizinhos analisados por Silva (2000, 2004) e Silva & Rodrigues (2008), é provável que o espécime PT3404 possa ser diferente daqueles do Brasil, considerando-se a distância geográfica e diversidade ecológica das regiões nas quais a espécie ocorre nos territórios vizinhos (Chaco Seco, Chaco Úmido, Campos e Espinhal), em comparação ao hábitat ocupado no Brasil (Brown *et al.*, 2005).

A possibilidade de que a sequência PT3404, depositada no GenBank por Castoe & Parkinson (2006), não corresponda, de fato, à *B. diporus* é remota, dado que esta é

a única espécie do grupo *neuwiedi* de ocorrência registrada para a região. No entanto, poucos exemplares pertencentes aos territórios vizinhos foram analisados na revisão taxonômica realizada por Silva (2000, 2004) e Silva & Rodrigues (2008). Além disso, existe uma lacuna na amostragem da análise molecular referente a esta região.

Posada & Crandall (2001) e Funk & Omland (2003), entre outros, afirmam que uma amostra apropriada é crucial para o desenvolvimento de estudos filogenéticos, e que o não monofiletismo das espécies em algumas análises pode ser decorrente de uma amostragem insuficiente. Caso os resultados obtidos aqui sejam recuperados em uma análise com uma amostragem mais ampla, *B. diporus* da Argentina teria prioridade pelo nome, em função do holótipo pertencer à localidade Rio Vermejo, fronteira entre Paraguai e Argentina (Silva & Rodrigues, 2008) e os espécimes do Brasil seriam candidatos a uma nova espécie.

- Bothrops neuwiedi

B. neuwiedi apresentou polifiletismo, sendo recuperada em três linhagens (L, M e I), que compõem o clado mais inclusivo F. Os exemplares classificados com base na morfologia como pertencentes à espécie e recuperados nos três clados estão distribuídos ao longo de cadeias montanhosas na costa leste brasileira. Apesar de não ocorrer simpatria na presente amostra, os três clados conectam suas distribuições pelo compartilhamento de haplótipos de Ouro Branco (MG) (TM136 e TM142) nos clados L e M e em São Gonçalo do Rio Preto (MG) (TM14 e TM07) nos clados L e I.

Espécimes de cada um dos três clados possuem elevada distância genética em relação aos demais clados da filogenia. A menor distância observada é entre os clados L e M, e subsequentemente entre os clados L e M e o clado I. Esse valores entre L e M, porém, são concordantes com valores de distâncias descritos para diferentes espécies de serpentes do gênero *Morelia* (Rawlings & Donnellan, 2003).

O quadro polifilético aqui observado demonstra que geneticamente existem pelo menos duas linhagens bem distintas (L e I), que necessitam de uma análise mais detalhada a fim de verificar a possibilidade de caracterização de uma nova entidade taxonômica. A distribuição geográfica dos representantes dos clados L e I é um argumento a favor da hipótese de serem entidades diferentes. A linhagem exclusiva no clado L, pertence a localidades na Serra do Espinhaço em Minas Gerais, com exceção do exemplar de Ibiúna (SP). O clado I reúne a maior parte dos exemplares

analisados, distribuídos na região da Serra da Mantiqueira, e ambas as linhagens estão sob o domínio de províncias fitogeográficas distintas (Ratter *et al.*, 2003; Bridgewater *et al.*, 2004) (Figura 22).

Apenas um haplótipo de *B. neuwiedi* ocorre no clado M, que poderia ser explicado por ocorrência de homoplasia molecular (semelhança causada por paralelismo, convergência e mutações reversas), embora não possam ser descartadas as possibilidades de retenção de polimorfismo ancestral ou evento de introgressão no passado.

A retenção de polimorfismo ancestral é considerada um dos maiores desafios associados à inferência evolutiva de grupos que divergiram recentemente (Maddison & Knowles, 2006). Quando ocorre especiação, a história dos genes das novas linhagens passaria por um processo gradual de acúmulo de mudanças, levando do polifiletismo ao parafiletismo e, posteriormente, ao monofiletismo recíproco das linhagens (Slowinski, 2001; Avise, 2004). Entretanto, se a divisão ocorre muito rapidamente, a história gênica reflete o tempo antes do monofiletismo, inconsistente com a filogenia de espécies, de modo que estes genes podem ser retidos por muito tempo na escala evolutiva (Funk & Omland, 2003; Edwards *et al.*, 2005).

Do ponto de vista morfológico, Silva (2000, 2004) e Silva & Rodrigues (2008) encontraram um padrão conservado de manchas para *B. neuwiedi*, resultado contrastante com a análise molecular, que sugere a existência de espécies crípticas.

- Bothrops mattogrossensis

B. mattogrossensis apresenta-se polifilética (clados J e K), não isolada geograficamente, mas com elevada distância genética em relação aos demais clados. Uma das discordâncias sobre o monofiletismo da espécie tem relação com o exemplar TM173 de Serra da Borda (MT), que morfologicamente assemelha-se a *B. mattogrossensis*, mas não agrupa com os demais exemplares, ocupando uma posição incerta no clado K.

O clado J agrupa os demais exemplares de *B. mattogrossensis*, com alguns exemplares de *B. marmoratus*, *B. pauloensis* e o espécime intermediário entre *B. marmoratus* e *B. mattogrossensis*. Estes espécimes estão estruturados em quatro subclados, cuja distância genética interna é baixa, mas entre os agrupamentos é relativamente elevada. Adicionalmente, haplótipos da Chapada dos Guimarães e

Cuiabá (MT) são recuperados simultaneamente em dois agrupamentos, uma evidência que pode ser interpretada como fluxo gênico ou homoplasia molecular.

De acordo com Strüssmann (comunicação pessoal), o exemplar TM173 de Serra da Borda (MT) ocorre em elevada altitude, com características morfológicas e ecológicas distintas dos demais *B. mattogrossensis.* Portanto, dados filogenéticos, distância genética, isolamento geográfico e morfológico sugerem que o exemplar seja analisado minuciosamente, com a possível caracterização de uma nova espécie.

Os subclados do clado J em conjunto com os valores de distância e dados de distribuição geográfica, poderiam ser interpretados como evidências da existência de novas entidades taxonômicas, que teriam começado a divergir recentemente e que necessitam de uma melhor caracterização. Por outro lado, esses exemplares poderiam ser considerados uma única entidade taxonômica, cuja variação intraespecífica é confundida com a interespecífica, similarmente ao detectado para os complexos de serpentes *Elaphe obsoleta* e *Elaphe guttata*, tradicionalmente diagnosticadas pelo padrão de coloração e/ou manchas muito divergentes, com sete e cinco subespécies, respectivamente. Os dados moleculares a partir de sequências do citocromo *b*, isolamento geográfico e distância genética foram essenciais para compreender que os complexos de subespécies delimitados pela morfologia não representavam unidades evolutivas distintas, mas apenas três espécies plenas em cada um dos complexos (Burbrink *et al.*, 2000; Burbrink, 2001, 2002). Neste caso, uma mudança no sistema taxonômico foi a solução proposta para o polifiletismo observado, que também poderia ser causado por retenção de polimorfismo ancestral.

- Bothrops marmoratus

B. marmoratus é polifilética, não isolada geograficamente e com elevada distância genética entre os demais clados. A espécie ocorre em três clados (M, N e J) com distâncias genéticas elevadas entre os exemplares. O clado M concentra a maior parte dos espécimes; os exemplares do clado N agrupam em um subclado com vários representantes de *B. pauloensis* de Goiás, ambos com distribuições geográficas concentradas na região central do Brasil. Os espécimes de *B. marmoratus* do clado J agruparam em um subclado que ocorre na região norte da distribuição geográfica, disjunta da distribuição dos clados M e N.

As duas únicas ocorrências de simpatria que foram efetivamente detectadas em nossa amostra envolvem *B. marmoratus* e *B. pauloensis* dos clados M e N em Goiás:

de Jataí, um exemplar de *B. pauloensis* (TM112) é recuperado no clado N com o espécime de *B. marmoratus* (TM111); e de Goiânia, o exemplar de *B. pauloensis* (TM120) foi recuperado no clado M com o espécime de *B. marmoratus* (TM118). A presença de indivíduos com morfologia intermediária entre as espécies *B. pauloensis* e *B. marmoratus*, exemplares TM127 e TM119 (Aporé e Hidrolândia – GO), também ocorrem na região e estão no clado M.

A localidade de Goiânia (GO) necessita de maiores esclarecimentos, pois, além de ter sido detectada simpatria entre *B. marmoratus* e *B. pauloensis* (clados M e N), também foi detectado um exemplar de *B. pauloensis* (TM120) com haplótipo mitocondrial de *B. marmoratus*, evidenciado a possibilidade de uma zona de hibridação na região.

Os exemplares intermediários poderiam ser interpretados como híbridos naturais entre as duas espécies, e uma evidência da simpatria entre estas espécies em algum momento de suas histórias evolutivas. As localidades Aporé e Hidrolândia (GO) são evidências a favor desta hipótese, porque, além dos intermediários, possuem indivíduos com morfologia de apenas uma das espécies, tornando-se candidatas a maiores investigações. A situação de Aporé é ainda mais complexa, quando considerado que o haplótipo de *B. marmoratus/pauloensis* (TM127) é compartilhado por *B. marmoratus* de Orizona (TM126) e *B. pauloensis* de Goiânia (TM120).

Outra explicação para ocorrência destes exemplares de morfologia intermediária seria a grande sobreposição de caracteres entre as espécies, impossibilitando o discernimento entre uma e outra. Para certificar-se da ocorrência de híbridos naturais nestas localidades, serão necessários estudos populacionais com o uso de marcadores, como os microssatélites ou AFLPs (fragmentos amplificados de tamanhos polimórficos) (Mebert, 2008; Sequeira *et al.*, 2008).

O fato de não terem sido encontradas diferenças nos hemipênis das várias espécies do grupo *neuwiedi* somado à ocorrência de cruzamentos interespecíficos de *Bothrops* em cativeiro apoiariam a hipótese de cruzamentos ocorrerem também na natureza (Silva & Rodrigues, 2008; Balestrin *et al.*, 2002).

As ocorrência de simpatria, presença de indivíduos com morfologia intermediária, detecção de haplótipos compartilhados entre os clados M e N de *B. marmoratus* e *B. pauloensis*, e o fato de todos os exemplares estarem localizados no núcleo do Cerrado no Estado de Goiás, tornam a região candidata a uma zona de hibridação.

A hipótese de introgressão por contato secundário entre os clados M e N apresenta a favor a ocorrência de uma zona de transição entre as províncias fitogeográficas centro-oeste e centro-sudeste do Cerrado (Ratter *et al.*, 2003; Bridgewater *et al.*, 2004) (Figura 22).

Contato atual entre espécies, existência de indivíduos de morfologia intermediária e dados de DNA mitocondrial divergentes do morfológico são considerados como uma assinatura da introgressão genética recente (Funk & Omland, 2003). Com este padrão, existe o exemplo clássico de introgressão no DNA mitocondrial detectada nas populações norte-americanas de lobos e coiotes, que teriam entrado em contato devido à destruição dos seus hábitats (Lehman *et al.*, 1991). Outro exemplo para este padrão foi descrito por Lorenzen *et al.* (2006) em populações de antílopes do gênero *Kobus*, que ocorrem em parapatria no leste Africano. Dessa forma, em organismos cujos marcadores nucleares recuperam o mesmo padrão de reticulação dos marcadores mitocondriais, o padrão é interpretado como introgressão recente. Contudo, ainda que o marcador nuclear não recupere padrões similares de reticulação dos marcadores mitocondriais, mas for associado a ocorrência de zona de hibridação, o padrão também pode ser interpretado como introgressão recente, conforme sugerido para *Drosophila* do grupo *yakuba* (Bachtrog *et al.*, 2006).

A localidade Orizona (GO), cujo exemplar é recuperado no clado M, é a mais próxima de Ipameri (GO), localidade-tipo da espécie, fazendo com que o clado M tenha prioridade pelo nome (Silva, 2000, 2004; Silva & Rodrigues, 2008).

Os exemplares do clado J podem ter sido identificados como *B. marmoratus* em decorrência da convergência de caracteres morfológicos e serem considerados pertencentes à espécie predominante no clado J. No entanto, outras evidências (distância genética e isolamento geográfico) indicam que possam ser candidatos a uma nova espécie.

- Bothrops pauloensis

A espécie *B. pauloensis* possui o padrão mais complexo do grupo *neuwiedi*, sendo polifilética, não isolada geograficamente e com elevados valores de distância em relação à maioria dos clados. Os resultados obtidos neste trabalho recuperam representantes de *B. pauloensis* em quatro clados (M, N, I e J), geneticamente muito divergentes. O clado N agrupa a maior parte dos exemplares da espécie; os clados M,

I e J recuperam poucos exemplares de *B. pauloensis*, e agrupam em sua maioria, respectivamente: *B. marmoratus*, *B. neuwiedi* e *B. mattogrossensis*. Todos exemplares de *B. pauloensis* amostrados ocorrem no bioma Cerrado.

A questão de *B. pauloensis* dos clados N e M, já foi amplamente discutida no item sobre *B. marmoratus*. Todas as evidências apontam para a reticulação entre as duas espécies.

O compartilhamento de haplótipos (TM112 e TM 115) de *B. pauloensis* de Jataí entre os clados N e J, e os demais exemplares da espécie no clado J, poderiam ser interpretados como retenção de polimorfismo ancestral ou introgressão. Separar eventos de introgressão, da retenção de polimorfismo ancestral é uma tarefa difícil, pois, com a passagem do tempo evolutivo, qualquer distinção útil entre os dois processos será rapidamente perdida no processo estocástico (Sneath, 2000; Funk & Omland, 2003). Mas o uso concomitante de marcadores mitocondriais e nucleares possibilitaria o discernimento entre eventos de introgressão e retenção de polimorfismo ancestral, que não são eventos mutuamente exclusivos (Costa *et al.*, 1992; van Oppen *et al.*, 2001; Weickstein *et al.*, 2001; Vollmer & Palumbi, 2002; Alexandrino *et al.*, 2005; Weisrock *et al.*, 2005; Heckman *et al.*, 2007; Susnik *et al.*, 2007; Willyard *et al.*, 2008).

Os exemplares intermediários entre *B. pauloensis* e *B. neuwiedi* e os demais exemplares de *B. pauloensis* que agrupam com *B. neuwiedi*, também são indícios de que pode ter havido introgressão, mas como não foi detectada simpatria atual, estes eventos poderiam ter ocorrido no passado. A introgressão antiga é evidenciada quando duas linhagens que estão isoladas geograficamente compartilham marcadores nucleares que são divergentes do mitocondrial, que, por sua vez, coincide com a morfologia. Um exemplo de introgressão antiga foi descrito por Susnik et al. (2007), em que o DNA nuclear indicou que a truta do rio Jadro originou-se de um evento de hibridação entre trutas marrons da bacia adriática. A linhagem do Jadro compartilhou 59 alelos de microssatélites com a população de truta marron dos rios Krka e Zrmanja (Susnik et al., 2007). No entanto, esta linhagem também apresentou nove alelos de microssatélites exclusivos, pois a população teria ficado isolada tempo suficiente para começar a se diferenciar (Susnik et al., 2007). Em função do tempo de coalescência quatro vezes mais rápido no DNA mitocondrial, raramente o padrão reticulado neste marcador é interpretado como um evento de introgressão no passado.

Portanto, se novas amostras na região de ocorrência destes indivíduos e arredores não revelarem a existência de uma zona de hibridação atual entre estas espécies, uma análise mais detalhada poderá corroborar a hipótese de que sejam eventos antigos de hibridação.

Todas as evidências até então apresentadas na literatura são a favor da hipótese de uma entidade taxonômica única. *Bothrops pauloensis* apresenta diagnose muito distinta das demais espécies do grupo *neuwiedi*, exceto *B. marmoratus*, cujos caracteres são sobrepostos (Silva, 2000; 2004; Silva & Rodrigues, 2008). É considerada endêmica do Cerrado, ocorrendo em áreas abertas de vegetação seca sazonal (Valdujo *et al.*, 2002). Em estudo ecológico dos exemplares de Itirapina (SP), Parque Nacional das Emas (GO) e Reserva Ecológica do IBGE – RECOR (DF), não foi detectada variação geográfica nos aspectos ecológicos em *B. pauloensis* (Valdujo *et al.*, 2002), contrastando diretamente com os resultados moleculares obtidos para os exemplares destas mesmas localidades que estão neste trabalho e foram recuperados em clados distintos.

Bothrops pauloensis poderia ter ocupado uma distribuição mais abrangente no passado, e o polifiletismo e indivíduos de morfologia intermediária observados atualmente seriam evidências de introgressão genética onde houve contato com as espécies *B. neuwiedi, B. marmoratus* e *B. mattogrossensis*. Alternativamente, as linhagens I e J poderiam ser candidatas a entidades taxonômicas distintas, que, em função da convergência morfológica, são identificadas como a mesma espécie, similarmente ao observado no exemplo clássico em peixes cíclidios nos lagos do leste africano ou anfíbios Neotropicais do complexo *Rhinella marina* (Albertson *et al.*, 1999; Rübber *et al.*, 2001, Vallinoto *et al.*, 2010). Como a espécie-tipo de *B. pauloensis* é pertencente a Leme, localidade que se situa na região nordeste do Estado de São Paulo, os exemplares do clado I teriam prioridade pelo nome (Silva, 2000, 2004; Silva & Rodrigues, 2008).

Lamentavelmente, a rápida degradação ambiental do Cerrado em função da exploração econômica e a existência de raras unidades de conservação neste bioma comprometem os estudos da diversificação dos organismos e a conservação da biodiversidade. O quadro torna-se ainda mais grave considerando-se que a maior parte das linhagens do grupo *neuwiedi* ocorre no Cerrado, que está entre os 25 principais *hotspots* do planeta, e entre os cinco menos preservados (Ratter *et al.*, 1997; Myers *et al.*, 2000).

Os resultados apresentados proporcionam uma nova visão a cerca da complexidade biológica do grupo *neuwiedi*, que em função das interações biológicas e da sua história evolutiva, poderá não apresentar uma resolução taxonômica simples baseando-se nos dados existentes pretéritos e atuais.

Ao longo de todos estes anos, o único trabalho realizado com intuito de compreender melhor o grupo *neuwiedi* foi a revisão taxonômica realizada por Silva (2000, 2004) e Silva & Rodrigues (2008), com um amplo esforço de coleta de dados realizados. Hoje, pouco resta dos exemplares do grupo *neuwiedi* que foram estudados, dada a fatalidade ocorrida com a Coleção Herpetológica do Instituto Butantan que abrigava a maior parte destes exemplares. O que resta são os dados que foram coletados e a possibilidade de reavaliá-los sob uma nova perspectiva, em conjunto os dados de DNA mitocondrial.

Além disso, com a geração destas novas sequências para o grupo, cálculos de tempo de divergência mais precisos deverão ser realizados, uma vez que as estimativas mais próximas foram realizadas para *B. jararaca*, grupo irmão de *neuwiedi*, por Grazziotin *et al.* (2006). Os autores estimaram que as populações de *B. jararaca* teriam começado a se diferenciar há cerca de 3,8 milhões de anos. Poder-se-ia aventar, por aproximação, que a separação entre os grupos *jararaca* e *neuwiedi* tenha se iniciado ao menos há 3,8 milhões de anos, e que a divergência interna do grupo *neuwiedi* deva ser mais recente, tendo estado sob a influência das flutuações climáticas que ocorreram durante o Plio-Pleistoceno e as dinâmicas de expansão/retração entre as florestas e savanas, causando um padrão complexo de elevada biodiversidade (Haffer, 1969; Prado & Gibbs, 1993; Ratter *et al.*; 1997; Pennington *et al.*, 2000).

Poderá ser realizada a interpretação dos dados por meio de redes filogenéticas, que representam melhor a evolução reticulada e que poderão ser estimadas por algoritmos baseados em distância, parcimônia e verossimilhança ou análises de coalescência (Legendre, 2000; Maddison & Knowles, 2006; Heckman *et al.*, 2007; Posada & Cradall, 2001).

O uso de novos marcadores mitocondriais e nucleares para a ampliação dos estudos filogenéticos poderá garantir a realização de estudos populacionais, com exploração das zonas de hibridação detectadas, que poderão ser alvo de estudos do padrão de variação na frequência alélica e do fenômeno de redução de introgressão em marcadores ligados ao cromossomo sexual em relação aos marcadores

autossômicos, causada pela diminuição no valor adaptativo dos híbridos de sexo heterogamético, prevista pela Regra de Haldane (Funk & Omland, 2003; Johnson, 2008). Além de uma infinidade de outros estudos com abordagens multidisciplinares que, a partir deste momento, poderão direcionar seus objetivos em função do conhecimento gerado por estas análises.



Figura 22. Delimitação das quatro províncias fitogeográficas (linhas pretas contínua e descontínuas) obtidas por Ratter *et al.* (2003) e Bridgewater *et al.* (2004), sobrepostas à amostra do grupo *neuwiedi* utilizada neste trabalho, sendo:

PCO = Província Centro-Oeste

PN-NE = Província Norte-Nordeste

PCS = Província Centro-Sul

PS = Província Sul

🛑 erythromelas 🔘 lutzi 🜔 neuwiedi 🌒 marmoratus 🔘 pauloensis 🖯 mattogrossensis 🛡 diporus 🔘 pubescens

● Morfologia não confirmada 📙 B. mattogrossensis/marmoratus 📕 B. neuwiedi/pauloensis

Ao fundo, biomas do território brasileiro: AM = Amazônia, CE = Cerrado, PA = Pantanal, MA = Mata Atlântica e CM = Campos. Na localidade 1 (Jataí, GO) ocorreu simpatria de *B. marmoratus* e *B. pauloensis*; em 2 (Goiânia, GO), simpatria de *B. marmoratus* e *B. pauloensis*; em 3 (Aporé, GO), simpatria de *B. marmoratus/pauloensis* e *B. pauloensis*; em 4 (Hidrolândia, GO), simpatria de *B. marmoratus/pauloensis* e *B. marmoratus*.

6. CONCLUSÕES

Abordagens taxonômicas, ecológicas, biogeográficas, toxicológicas e filogenéticas têm contribuído de forma significante para o entendimento das serpentes Neotropicais, ainda pouco conhecidas. Os dados moleculares despontam entre as ferramentas mais promissoras e utilizadas atualmente, na tentativa de contribuir para a definição dos limites de espécies e, consequentemente, para melhor compreender a evolução e gerenciar a conservação destes organismos.

Com a caracterização realizada neste trabalho, o grupo *neuwiedi* representa um dos agrupamentos de serpentes Neotropicais que mais acumulou informações moleculares. Apesar de a compreensão do grupo estar apenas começando, já demonstra ser muito mais complexo do que se pode inferir a partir das abordagens até então realizadas. As atuais análises permitem concluir algumas tendências:

O grupo *neuwiedi* (clado A) é uma politomia formada pelo clado C (*B. erythromelas*), D (*B. lutzi*), F e G.

O clado F é composto pelas linhagens L (*B. neuwiedi*), M (*B. marmoratus, B. pauloensis*, intermediários entre *B. marmoratus* e pauloensis e *B. neuwiedi*), e I (*B. neuwiedi*, *B. pauloensis* e intermediários entre *B. neuwiedi* e pauloensis).

O clado G é composto pelas linhagens J (*B. mattogrossensis, B. marmoratus, B. pauloensis* e intermediários entre *B. mattogrossensis e marmoratus*), N (*B. pauloensis* e *B. marmoratus*), R (*B. diporus*), e S (*B. pubescens*).

Os clados F e G, são agrupamentos que ocupam, respectivamente, a região leste/centro-oeste e a região centro-oeste/sul, e se conectam na região central do Brasil no Estado de Goiás, pelos clados M e N.

As diferentes análises recuperaram três espécies atuais, definidas com base em caracteres morfológicos, reciprocamente monofiléticas: *B. erythromelas*, *B. lutzi* e *B. pubescens.*

Bothrops diporus, B. mattogrossensis, B. neuwiedi, B. marmoratus e B. pauloensis não se mostraram reciprocamente monofiléticas. Haplótipos de B. diporus e B. mattogrossensis foram recuperados em dois clados diferentes, B. neuwiedi e B. marmoratus em três clados, e B. pauloensis em quatro clados.

Os padrões parafiléticos e polifiléticos observados poderiam ser explicados por um arranjo taxonômico inadequado, retenção de polimorfismo ancestral, homoplasia molecular e eventos de introgressão genética antiga e recente na história evolutiva do grupo. A insuficiência e ineficiência de análises de similaridade geral da morfologia como critério diagnóstico destas espécies demonstram a necessidade premente de uma reavaliação do arranjo taxonômico corrente.

Os padrões de coloração e manchas das espécies *B. neuwiedi*, *B. diporus*, *B. pauloensis*, *B. marmoratus* e *B. mattogrossensis* recorrentes dentro do grupo, podem ser um indício de que a morfologia não seja eficiente para a detecção da diversidade do grupo, e o não monofiletismo na abordagem molecular evidencia a existência de espécies crípticas, que poderiam ser explicadas por retenção de morfologia ancestral ou convergência morfológica, promovidos pela seleção estabilizadora.

A observação de compartilhamento de haplótipos, simpatria e indivíduos de morfologia intermediária em uma zona de transição são fortes evidências de que as espécies *B. marmoratus* e *B. pauloensis* (clados M e N) sofreram introgressão genética recente em função de contato secundário, e sugerem a existência de uma zona de hibridação no Estado de Goiás.

Os demais clados com indivíduos de morfologia intermediária e compartilhamento de haplótipos entre localidades, sem evidência de simpatria atual, são candidatos a eventos de introgressão antiga, decorrentes de contatos ocorridos entre as espécies em algum momento de suas histórias evolutivas.

As análises filogenéticas em conjunto com dados de distância genética e de distribuição geográfica para o grupo *neuwiedi* podem estar evidenciando ao menos duas linhagens candidatas a novas espécies: *B. diporus* (PT3404) da Argentina e *B. mattogrossensis* (TM173) de Serra da Borda (MT).

Foram recuperadas nove linhagens, com o possível arranjo de nove espécies (embora qualquer decisão com base em um único marcador molecular deva ser evitada):

Linhagem C – *B. erythromelas* Linhagem D – *B. lutzi* Linhagem M – *B. marmoratus* Linhagem L - *Bothrops* sp. Linhagem I – *B. neuwiedi* Linhagem J – *B. mattogrossensis* Linhagem N - *B. pauloensis* Linhagem R – *B. diporus* Linhagem S – *B. pubescens* Apesar da ampla amostragem realizada neste trabalho para o grupo *neuwiedi*, algumas regiões precisam ser amostradas para uma caracterização molecular mais completa, como a região sudoeste brasileira e países que fazem fronteira com o Brasil, com um grande problema a ser transposto, a degradação ambiental com perda dos hábitats.

Novas análises incluindo outros marcadores moleculares, como genes nucleares e microssatélites, estimativas de tempo de divergência entre as espécies, bem como análises populacionais serão de extrema importância para a melhor compreensão da evolução do grupo, bem como a reavaliação do arranjo taxonômico corrente em conjunto com os dados mitocondriais aqui apresentados, de modo a implementar o conhecimento do grupo.

7. RESUMO

O grupo neuwiedi é composto por oito espécies amplamente distribuídas na diagonal das formações abertas da América do Sul: Bothrops diporus, B. erythromelas, B. lutzi, B. mattogrossensis, B. marmoratus, B. neuwiedi, B. pauloensis e *B. pubescens.* Foi utilizada uma amostra de 140 espécimes, com intuito de fornecer um teste independente, do limite das espécies e uma hipótese filogenética para os membros do grupo. As inferências filogenéticas realizadas a partir da máxima parcimônia, máxima verossimilhança e análise bayesiana, utilizando sequências de 1018 pb dos genes mitocondriais citocromo b e ND4 combinados, recuperaram topologias similares, nas quais as espécies do grupo neuwiedi formam um grupo monofilético com elevados valores de suporte. Foi recuperado o monofiletismo recíproco para as espécies B. erythromelas, B. lutzi e B. pubescens. Entretanto, B. diporus, B. mattogrossensis, B. neuwiedi, B. marmoratus e B. pauloensis apresentaram-se parafiléticas ou polifiléticas, como atualmente definidas. Haplótipos de Bothrops diporus e B. mattogrossensis foram recuperados em dois clados distintos, B. neuwiedi e B. marmoratus em três clados, e B. pauloensis em quatro clados. Os padrões parafiléticos e polifiléticos recuperados para os haplótipos podem ser decorrentes de um arranjo taxonômico inadequado, retenção de morfologia ancestral, convergência morfológica, plasticidade fenotípica, eventos de introgressão genética recente e antiga na história evolutiva do grupo, homoplasia molecular e retenção de polimorfismo ancestral, fenômenos que não são mutuamente exclusivos. O compartilhamento de haplótipos de DNA mitocondrial, simpatria e indivíduos de morfologia intermediária entre B. marmoratus e B. pauloensis são evidências que sugerem a ocorrência de introgressão recente e a existência de uma zona de hibridação na região central do Brasil. As inferências filogenéticas para o grupo neuwiedi sugerem a possível existência de espécies crípticas, demonstrando a necessidade premente de uma reavaliação da taxonomia corrente, a partir da análise conjunta dos dados morfológicos e DNA mitocondrial aqui apresentados. Também serão necessários estudos complementares a partir de marcadores nucleares. Esta pesquisa, quando comparada aos estudos filogenéticos prévios, representa um marcante aumento na quantidade e qualidade da amostragem para o grupo neuwiedi, incluindo todas as espécies atualmente reconhecidas e amostra de 140 indivíduos para 92 localidades de 13 Estados do Brasil, fornecendo importantes informações para o entendimento e conservação da biodiversidade das serpentes Neotropicais.

8. ABSTRACT

The *neuwiedi* group of species of the genus *Bothrops* is widespread in open areas of South America, and it is composed by eight current species: Bothrops diporus, B. erythromelas, B. lutzi, B. mattogrossensis, B. marmoratus, B. neuwiedi, B. pauloensis, and B. pubescens. A total of 140 samples were used to provide an independent test of the species boundaries and a hypothesis of phylogenetic relationships among the members of this group. Our combined data (1018 bp of cyt b and ND4 from mtDNA) recovered the *neuwiedi* group as a highly supported monophyletic group in Maximum Parsimony, Maximum Likelihood and Bayesian Analyses. Reciprocal monophyly for each B. erythromelas, B. lutzi and B. pubescens was recovered. However, B. diporus, B. mattogrossensis, B. neuwiedi, B. marmoratus and *B. pauloensis* showed to be paraphyletic and polyphyletic as currently defined. Haplotypes from each *B. diporus* and *B. mattogrossensis* were recovered in two different clades, B. neuwiedi and B. marmoratus were recovered in three clades, and *B. pauloensis* in four clades. The lack of monophyletic species could be explained by imperfect taxonomic analysis method, retention of ancestral morphology, convergent morphology, plasticity phenotipic, recent and ancient introgression, molecular homoplasy and incomplete lineage sorting, and these phenomena are not mutually exclusive.

Sympatry, phenotipycally intermediate specimens and mtDNA haplotypes shared between *B. marmoratus* and *B. pauloensis*, provide evidences for recent introgression and the possibility of occurrence of a hybrid zone in Central Brazil. These phylogenetic inferences within *neuwiedi* group suggest the possible occurrence of cryptic species which were no detected morphologically, and the necessity of a current taxonomy review based on combining data presented here to morphological data. Compared to previous phylogenetic studies, the investigation presented here represents a remarkable increasing in quantity and quality concerning the group sampling, since it includes all the currently recognized species and samples of 140 individuals from 92 localities of 13 states of Brazil. It has never been done before, and supplies important information for understanding and to the conservation of Neotropical snake biodiversity.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERT, V.A. **Parsimony, Phylogeny, and Genomics**. New York: Oxford University, 2006, 207 p.
- ALBERTSON, R.C.; MARKERT, J.A.; DANLEY, P.D.; KOCHER, T.D. Phylogeny of a rapidly evolving clade: the cichlid fishes of Lake Malawi, East Africa. Proc. Natl. Acad. Sci., v. 96, p. 5107–5110, 1999.
- ALEXANDRINO, J.; BAIRD, S.J.E.; LAWSON, L.; MACEY, J.R.; MORITZ, C.; WAKE, D.B. Strong selection against hybrids at hybrid zone in the *Ensatina* ring species complex and its evolutionary implications. **Evolution**, v. 59, n. 6, p. 1334-1347, 2005.
- ALFARO, M.E.; ZOLLER, S.; LUTZONI, F. Bayes or bootstrap? A simulation study comparing the performance of Bayesian Markov Chain Monte Carlo sampling and bootstrapping in assessing phylogenetic confidence. **Molecular Biology and Evolution**, v. 20, n. 2, p. 255-266, 2003.
- AMARAL, A. New genera and species of snakes. **Proceedings of the New England Zoological Club**, v. 8. p. 85-105, 1923.
- AMARAL, A. A general consideration of snake poisoning and observations on Neotropical pit-vipers. Contributions of Harvard Institute of Tropical Biology and Medicine, v. 2, p. 1-64, 1925.
- AMARAL, A. Novos gêneros e espécies de ophidios brasileiros. **Arquivos do Museu Nacional**, Rio de Janeiro, v. 26, p. 96-121, 1926.
- AMARAL, A. Studies of Neotropical Ophidia IV: a new form of Crotalidae from Bolivia. **Bull. Antivenin Inst. America**, v. 1, p. 5-6, 1927.
- AMARAL, A. Studies of Neotropical Ophidia XXV: a new race of *Bothrops neuwiedii*. **Bull. Antivenin Inst. America**, v. 4, p. 65-67, 1930.
- AMARAL, A. Contribuição ao conhecimento dos ofídios do Brasil V: uma nova raça de *Bothrops neuwiedii*. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 7, p. 97-98, 1933.
- AMARAL, A. Contribuição ao conhecimento dos ofídios do Brasil: lista remissiva dos ophidios do Brasil. 2 ed. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 10, p. 87-162, 1937.
- APESTEGUÍA, S. La evolution de los lepidosaurios. **Investigación y Ciência**, abril, p. 54-63, 2007.
- ARÉVALO, E.; DAVIS, S.K.; SITES JR., J.W. Mitochondrial DNA divergence and phylogenetic relationships among eight chromosome races of the *Sceloporus grammicus* complex (Phrynosomatidae) in central Mexico. **Systematic Biology**, v. 43, n. 3, p. 387-418, 1994.
- ASHTON, K.G.; DE QUEIROZ, A. Molecular systematics of the Western rattlesnake, *Crotalus viridis* (Viperidae), with comments on the utility of the D-Loop in phylogenetic studies of snakes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 21, n. 2, p. 176–189, 2001
- AVISE, J.C. **Phylogeography: the history and formation of species**. Cambridge: Harvard University, 2000, 447 p.
- AVISE, J.C. Molecular markers, natural history and evolution. 2 ed. New York: Chapman & Hall, 2004, 683 p.

- AVISE, J.C. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**, v. 36, p. 3-15, 2009.
- BACHTROG, D.; THORNTON, K.; CLARK, A.; ANDOLFATTO, P. Extensive introgression of mitochondrial DNA relative to nuclear genes in the *Drosophila yakuba* species group. **Evolution**, v. 60, n. 2, p. 292-302, 2006.
- BAKER, R.J.; BRADLEY, R.D. Speciation in mammals and the genetic species concept. Journal of Mammalogy, v. 87, n. 4, p. 643–662, 2006.
- BALESTRIN, R.L.; LEITÃO-DE–ARAUJO, M.; ALVES, M.L.M. Ocorrência de híbridos não naturais entre *Bothrops jararaca* e *B. neuwiedi* (Serpentes, Viperidae). Iheringia, v. 92, n. 1, p. 85-90, 2002.
- BEÇAK, W. Karyotypes, sex chromosomes, and chromosomal evolution in snakes. In: BUCHERL, W. (Ed.). Venomous animals and their venom. New York- London: Academic, 1967, p. 53-96.
- BEÇAK, W.; BEÇAK, M.L. Cytotaxonomy and chromosomal evolution in Serpentes. Cytogenetics, v. 8, p. 247-262, 1969.
- BECHTEL, H.B. Color and pattern in snakes (Reptilia, Serpentes). Journal of Herpetology, v. 12, n. 4, p. 521-532, 1978.
- BELLUOMINI, H.E. Extraction and quantities of venom obtained from some Brazilian snakes. In: BÜCHERL, W.; BUCKLEY, E.E.; DEULOFEU, V. (eds.). Venomous animals and their venoms. v. 1: Venomous vertebrates. New York: Academic, 1971, p. 98-132.
- BICKFORD, D.; LOHMAN, D.J.; SODHI, N.S.; NG, P.K.L.; MEIER, R.; WINKER, K.; INGRAM, K.K.; DAS, I. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 22, n. 3, p. 148-155, 2007.
- BICKHAM, J.W.; WOOD, C.C.; PATON, J.C. Biogeographic implications of cytochrome *b* sequences and allozymes in sockeye (*Oncorhynchus nerka*). **The Journal of Heredity**, v. 86, n. 2, p. 140-144, 1995.
- BRIDGEWATER, S.; RATTER, J.A.; RIBEIRO, J.F. Biogeographic patterns β-diversity and dominance in the cerrado biome of Brazil. **Biodiversity and Conservation**, v. 13, p. 2295–2318, 2004.
- BRODIE III, E.D. Differential avoidance of coral snake banded patterns by free-ranging avian predators in Costa Rica. **Evolution**, v. 47, p. 227–235, 1993.
- BROWER, A.V.Z.; DESALLE, R.; VOGLER, A. Gene trees, species trees and systematics: a cladistic perspective. **Annu. Rev. Ecol. Syst.**, v. 27, p. 423–450, 1996.
- BROWN, A.; ORTIZ, U.M.; ACERBI, M.; CORCUERA, J. (Eds.) La situación ambiental Argentina 2005. Buenos Aires: Fundación Vida Silvestre Argentina, 2005.
- BROWN, J.M.; LEMMON, A.R. The importance of data partitioning and the utility of Bayes factors in bayesian phylogenetics. **Systematic Biology**, v. 56, p. 643–655, 2007.
- BUCKLEY, T.R.; SIMON, C.: CHAMBERS G.K. Exploring amongsite rate variation models in a maximum likelihood framework using empirical data: effects of model assumptions on estimates of topology, branch lengths, and bootstrap support. Systematic Biology, v. 50, p. 67–86, 2001.

- BURBRINK, F.T. Systematics of the eastern ratsnake complex (*Elaphe obsoleta*). Herpetological Monographs, v. 15, p. 1-53, 2001.
- BURBRINK, F.T. Phylogeographic analysis of the corn snake (*Elaphe guttata*) complex as inferred from maximum likelihood and Baeysian analyses. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 25, p. 465-476, 2002.
- BURBRINK, F.T.; LAWSON, R.; SLOWINSKI, J.B. Mitochondrial DNA phylogeography of the North American ratsnake (*Elaphe obsoleta*): a critique of the subspecies concept. **Evolution**, v. 54, p. 2107-2114, 2000.
- BURGER, W.L. Genera of pitvipers (Serpentes: Crotalidae). Tese (Doutorado) não publicada, Universidade do Kansas, Lawrence, 1971.
- CADLE, J.E. Geographic distribution: problems in phylogeny and zoogeography. In: SEIGEL, R.A.; COLLINS, J.T.; NOVAK, S.S. (Eds.). **Snakes: Ecology and Evolutionary Biology.** New York: Macmillan, 1987, p. 77-105.
- CADLE, J.E. Phylogenetic relationships among vipers: immunological evidence. In: CAMPBELL, J.A. & BRODIE JR., E.D. (Eds.). **Biology of the pitvipers.** Texas: Selva, 1992, p. 41-48.
- CAMPBELL, J.A.; LAMAR, W.W. **The venomous reptiles of Latin America.** New York: Cornell University Press, 1989, 425 p.
- CAMPBELL, J.A.; LAMAR, W.W. The venomous reptiles of the Western Hemisphere. (v. 2) New York: Cornell University, 2004, 870 p.
- CASTOE, T.A.; PARKINSON, C.L. Bayesian mixed models and phylogeny of pitvipers (Viperidae, Serpentes). **Molecular Phylogenetics and Evolution,** v. 39, p. 91-110, 2006.
- CASTOE, T.A; SMITH, E.N.; BROWN R.M.; PARKINSON C.L. Higher-level phylogeny of Asian and American coralsnakes, their placement within the Elapidae (Squamata), and the systematic affinities of the enigmatic Asian coralsnake *Hemibungarus calligaster* (Wiegmann, 1834) **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 151, p. 809–831, 2007.
- CASTOE, T.A.; DAZA, J.M.; SMITH, E.N.; SASA, M.M.; KUCH, U.; CAMPBELL, J.A., CHIPPINDALE, P.T.; PARKINSON, C.L. Comparative phylogeography of pitvipers suggests a consensus of ancient Middle American highland biogeography. **Journal of Biogeography**, v. 36, p. 88-103, 2009.
- CASTRO JR, N.C. Comparação do potencial neutralizante dos soros antibotrópico comercial e experimental frente às atividades biológicas dos venenos de *Bothrops jararaca* e *Bothrops erythromelas*. Dissertação (Mestrado) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2008.
- COCHRAN, D.M. Type specimens of repitiles and amphibians in the United States Nacional Museum. **Bulletin of U. S. Nacional Museum**, v. 220, p. 1-291, 1961.
- COPE, E.D. Catalogues of the repitiles obtained during the explorations of the Paraná, Paraguay, Vermejo e Uruguay [sic] rivers by Capt. Thos. J. Page, U. S. N., and those procured by Lieut. N. Michler, U. S. Top. Eng., commander of the expedition conducting the survey of the Atrato river. **Proceedings of the Academy of Natural Sciences of the Philadelphia**, v. 1862, p. 346-359, 1862.
- COPE, E.D. Seventh contribution of the herpetology of Tropical America. **Proceedings of the American Philosophical Society**, v. 2, p. 147-169, 1870.

- COPE, E.D. Twelfth contribution to the herpetology of Tropical America. **Proceedings** of the American Philosophical Society, v. 22, p. 167-194, 1885.
- COSTA, R.; PEIXOTO, A.A.; BARBUJANI, G.; KYRIACOU, C.P. A latitudinal cline in *Drosophila* clock gene. **Proceedings of Royal Society of London Series B**, v 250, p. 43-49, 1992.
- CUMMINGS, M.P.; HANDLEY, S.A.; MYERS, D.S.; REED, D.L.; ROKAS, A.; WINKA, K. Comparing bootstrap and posterior probability values in the four-taxon case. **Systematic Biology**, v. 52, n. 4, p. 477-487, 2003.
- DAZA, J.M.; SMITH, E.N.; PÁEZ, V.P.; PARKINSON, C.L. Complex evolution in the Neotropics: The origin and diversification of the widespread genus *Leptodeira* (Serpentes: Colubridae). Molecular Phylogenetics and Evolution, v. 53, p. 653-667, 2009.
- DEGNAN, J.H.; ROSENBERG, N.A. Discordance of species trees and their most likely gene trees. **PLoS Genetics**, v. 2, n. 5, p. 762-768, 2006.
- DEGNAN, J.H.; ROSENBERG, N.A. Gene tree discordance, phylogenetic inference and the multispecies coalescent. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 24, n. 6, p. 332-340, 2009.
- DESJARDINS, P.; MORAIS, R. Sequence and gene organization of the chiken mitochondrial genome: a novel gene order in higher vertebrates. Journal of Molecular Biology, v. 212, p. 599-634, 1990.
- DONG, S.; KUMAZAWA, Y. Complete mitochondrial DNA sequences of six snakes: phylogenetic relationships and molecular evolution of genomic features. **Journal** of Molecular Evolution, v. 61, n. 1, p. 12–22, 2005.
- DUBEY, S.; MICHAUX, J.; BRÜNER, H., HUTTERER, R.; VOGEL, P. False phylogenies on wood mice due to cryptic cytochrome-*b* pseudogene. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 50, p. 633-641, 2009.
- EDGAR, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1792-1797, 2004.
- EDWARDS, S.V.; JENNINGS, W.B.; SHEDLOCK A.M. Phylogenetics of modern birds in the era of genomics. **Proceedings of Royal Society of London Series B**, v. 272, p. 979–992, 2005.
- ERIXON, P.; SVENNBLAD, B.; BRITTON, T.; OXELMAN, B. Reliability of Bayesian posterior probabilities and bootstrap frequencies in phylogenetics. **Systematic Biology**, v. 52, n. 5, p. 665-673, 2003.
- ESCOBAR, H. (2010) Incêndio destrói coleção de cobras do Butantã: chamas consumiram mais de 500 mil exemplares de serpentes, aranhas e escorpiões em vidros com álcool; para cientistas, prejuízo é "incalculável". **Jornal O Estado de São Paulo**, São Paulo, 16 jun. 2010. Disponível em:

<<u>http://www.estadao.com.br/estadaodehoje/20100516/not_imp552413,0.php</u>> Acesso em 18 de jun. 2010.

- FELSENSTEIN, J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. Journal of Molecular Evolution, v. 17, n. 6, p. 368-376, 1981.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, n. 4, p. 783-791, 1985.

FELSENSTEIN, J. Inferring Phylogenies. Massachusetts: Sinauer Associates, 2004, 664 p.

- FENWICK, A. M.; GUTBERLET JR, R. L.; EVANS, J.A.; PARKINSON, C. L. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 156, p. 617-640, 2009.
- FERNANDES, W.; ABE, A.S. An eletrophoretic approach to the relationships among the subspecies of the lancehead *Bothrops neuwiedi* (Serpentes, Viperidae). **Zool.** Anz., v. 226, n. 3/4, p. 195-201, 1991.
- FERNANDES, W.; PESANTES, O.S. Relacionamento entre as espécies do grupo Bothrops atrox (Serpentes: Viperidae) pela eletroforese do plasma. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, 26, 1989, João Pessoa. Livro de Resumos XVI Congresso Brasileiro de Zoologia, João Pessoa: UFPB, 1989, p. 75.
- FERNANDES, W.; ABE, A.S.; PESANTES, O.S. Sobre as afinidades de Bothrops brazili, B. iglesiasi, B. itapetiningae e B. marajoensis estabelecidas através da morfologia do hemipênis (Serpentes: Viperidae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, 28, 1991, Salvador. Livro de Resumos XVIII Congresso Brasileiro de Zoologia, Salvador: UFBA, 1991, p. 336.
- FERRAREZZI, H. Uma sinopse dos gêneros e classificação das Serpentes (Squamata): I. Scolecophidia e Aletinophidia não colubrídeos. In: NASCIMENTO, L.B.; BERNARDES, A.T.; COTTA, G.A. (Eds.). Herpetologia no Brasil (v. 1). Belo Horizonte: PUCMG, Fundação Biodiversitas, Fundação Ezequiel Dias, 1994, p. 69-80.
- FETZNER, J. Extracting high-quality DNA from shed reptiles skins: a simplified method. **BioTechnques**, v. 26, p. 1052-1054, 1999.
- FOUQUET, A.; GILLES, A.; VENCES, M.; MARTY, C.; BLANC, M.; GEMMELL, N.J. Underestimation of species richness in neotropical frogs revealed by mtDNA analyses. PLoS ONE, v. 2, n. 10, out., 2007. Disponível em: <<u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles</u>> Acesso em 10 de jan. 2010.
- FRY, B. G.; VIDAL, N.; NORMAN, J.A.; VONK, F.J.; SCHEIB, H.; RAMJAN, S.F.R.; KURUPPU, S.; FUNG; K.; HEDGES, S.B.; RICHARDSON, M.K.; HODGSON, W. C.; IGNJATOVIC, V.; SUMMERHAYES, R.; KOCHVA, E. Early evolution of the venom system in lizards and snakes. Nature, v. 439, p. 584-588, 2005.
- FUNK, D.J.; OMLAND, K.E. Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst., v34, p. 397-423, 2003.
- FURTADO M.F.D.; TRAVAGLIA-CARDOSO, S.R.; ROCHA, M.M.T. Sexual dimorphism in venom os *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae). **Toxicon**, v. 48, p. 401-410, 2006.
- GEURGAS, S.R.; RODRIGUES, M.T.; MORITZ, C. The genus *Coleodactylus* (Sphaerodactylinae, Gekkota) revisited: a molecular phylogenetic perspective. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 49, p. 92-101, 2008.
- GOLOBOFF, P.A., FARRIS, J.S.; NIXON, K.C. TNT, a free program for phylogenetic analysis. **Cladistics**, v. 24, n. 5, p. 774-786, 2008.

- GRAZZIOTIN, F.G.; MONZEL, M.; ECHEVERRIGARAY, S.; BONATTO, S.L. Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. **Molecular Ecology**, v. 15, p. 3969-3982, 2006.
- GREENE, H.W. The ecological and behavioral context of pitviper evolution. In: CAMPBELL, J.A.; BRODIE JR., E.D. (eds). **Biology of the Pitvipers.** Texas: Selva, 1992, p.107–118.
- GUTBERLET JR., R.L.; CAMPBELL, J.A. Generic recognition for a neglected lineage of South American pitvipers (Squamata: Viperidae: Crotalinae), with the description of a new species from the Colombian Chocó. **Am. Mus. Novitat.**, v. 3316, p. 1-15, 2001.
- HAFFER, J. Speciation in Amazonian forest birds. Science, v. 165, p. 131–137, 1969.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser., v. 41, p. 95-98, 1999.
- HARTMANN, M.T.; HARTMANN, P.A.; CECHIN, S. Z.; MARTINS, M. Feeding habits and habitat use in *Bothrops pubescens* (Viperidae, Crotalinae) from Southern Brazil. **Journal of Herpetology**, v. 39, n. 4, p. 664–667, 2005.
- HECKMAN, K.L.; MARIANI, C.L.; RASOLOARISON, R.; YODER, A.D. Multiple nuclear loci reveal patterns of incomplete lineage sorting and complex species history within western mouse lemurs (Microcebus). **Molecular Phylogenetics** and Evolution, v. 43, p. 353–367, 2007.
- HEDGES, S.B.; VIDAL, N. Lizards, snakes, and amphisbaenians (Squamata). In: HEDGES, S.B.; KUMAR, S. (Eds.). The Timetree of Life. New York: Oxford University, 2009, p. 383-389.
- HEDGES, S.B.; COULOUX, A.; VIDAL, N. Molecular phylogeny, classification, and biogeography of West Indian racer snakes of the Tribe Alsophiini (Squamata, Dipsadidae, Xenodontinae). **Zootaxa**, v. 2067, p. 1-28, 2009.
- HOEKSTRA, H.E. Genetics, development and evolution of adaptive pigmentation in vertebrates. **Heredity**, v. 97, p. 222–234, 2006.
- HOGE, A.R. Note sur la position systematique de *Trigonocephalus (Bothrops) pubescens* Cope 1869. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 28, p. 83-84, 1959 [1957/58].
- HOGE, A.R. Preliminary account on Neotropical Crotalinae (Serpentes, Viperidae). **Memórias do Instituto Butantan**, v. 32, p. 109-184, 1966 [1965].
- HOGE, A.R.: ROMANO-HOGE, S.A.R.W.L. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. 2 ed. Memórias do Instuto Butantan, v. 42/43, p. 373-496, 1980 [1978/79].
- HUELSENBECK, J.P.; RANNALA, B. Frequentist properties of Bayesian posterior probabilities of phylogenetic trees under simple and complex substitution models. **Systematic Biology**, v. 53, n. 6, p. 904–913, 2004.
- HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. Bayesian analysis of molecular evolution using MrBayes. In: NIELSEN, R. (ed.). Statistical Methods in Molecular Evolution. New York: Springer, 2005, p. 182–232.
- JANEIRO-CINQUINI, T.R.F.; CARDOSO JR., R.P.; ABE, A.S.; SEGURA, O.P. Agrupamento de serpentes do gênero *Bothrops* pelos caracteres do hemipênis

(Serpentes: Viperidae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, 24, 1987, Juiz de Fora. Livro de Resumos XIV Congresso Brasileiro de Zoologia, Juiz de Fora: UFMG, 1987, p. 358.

- JIANG, Z.J.; CASTOE, T.A.; AUSTIN; C.C.; BURBRINK, F.T.; HERRON, M.D.; MCGUIRE, J.A., PARKINSON, C.L.; POLLOCK, D.D. Comparative mitochondrial genomics of snakes: extraordinary substitution rate dynamics and functionality of the duplicate control region. **BMC Evolutionary Biology**, v. 123, n. 7, p. 1-14, 2007.
- JOBB, G.; VON HAESELER, A.; STRIMMER, K. Treefinder: a powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. **BMC Evolutionary Biology**, v. 4, p. 18, 2004.
- JOHNSON, N.A. Haldane's rule: the heterogametic sex. Nature Education, v. 1, n. 1, p. 1-6, 2008.
- KELLY, C.M.R.; BARKER, N.P.; VILLET, M.H.; BROADLEY, D.G.; BRANCH, W.R. The snake family Psammophiidae (Reptilia: Sepentes): phylogenetics and species delimitation in the African sand snakes (*Psammophis* Boie, 1825) and allied genera. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 47, p. 1045-1060, 2008.
- KEOGH, J.S.; BARKER, D.G.; SHINE, R. Heavily exploited but poorly known: systematics and biogeography of commercially harvested pythons (*Python curtus* group) in Southeast Asia. Biological Journal of the Linnean Society, v. 73, p. 113–129, 2001.
- KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution, v. 16, p. 11-120, 1980.
- KNOWLES, L.L. Tests of Pleistocene speciation in montane grasshoppers (genus Melanopus) from the sky islands of western North America. Evolution, v. 54, p. 1337–1348, 2000.
- KOCHER, T.D.; THOMAS, W.K.; MEYER, A.; EDWARDS, S.V.; PÄÄBO, S.; VILLABLANCA, F.X.; WILSON, A.C. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. **Proceedings of National Academy of Science USA**, v. 86, p. 6196-6200, 1989.
- KRAUS, F.; MINK, D.G.; BROWN, W.M. Crotaline intergeneric relationships based on mitochondrial DNA sequence data. **Copeia**, v. 4, p. 763-773, 1996.
- KUMAZAWA, Y.; OTA, H.; NISHIDA, M.; OZAWA, T. Gene rearragements in snake mitochondrial genomes: highly concerted evolution of control-region-like sequences duplicated and inserted into a tRNA gene cluster. **Molecular Biology** and Evolution, v. 13, n. 9, p. 1242-1254, 1996.
- KUMAZAWA, Y.; OTA, H.; NISHIDA, M.; OZAWA, T. The complete nucleotide sequence of a snake (*Dinodon semicarinatus*) mitochondrial genome with two identical control regions. **Genetics**, v. 150, p. 313-329, 1998.
- LACERDA, J.B. Leçons sur le venin des serpents du Brésil et sur la méthode de traitement de morsures venimeuses par le permanganate de potasse. Rio de Janeiro: Lombaerts, 1884, 194 p.

- LARGET, B. Introduction to Markov Chain Monte Carlo methods in molecular evolution. In: NIELSEN, R. (Ed). **Statistical Methods in Molecular Evolution**. New York: Springer, 2005, p. 45-62.
- LEGENDRE, P. Reticulate Evolution: from bacteria to philosopher. Journal of Classification, v. 17, p. 153-157, 2000.
- LEHMAN, N.; EISENHAWER, A.; HANSEN, K.; MECH, L.D.; PETERSON, R.O.; GOGAN, P.J.P.; WAYNE, R.K. Introgression of coyote mitochondrial DNA into sympatric North American gray wolf populations. **Evolution**, v. 45, n. 1, p. 104-119, 1991.
- LEIMAR, O. The evolution of phenotypic polymorphism: randomized strategies versus evolutionary branching. **The American Naturalist**, v. 165, n. 6, p. 669-681, 2005.
- LEMA, T.; VIEIRA, M.I.; ARAUJO, M. L. Fauna reptiliana do norte da Grande Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Rev. Brasil. Zool.**, v. 2, n. 4, p. 203-227, 1984.
- LEME, A.F.P.; KITANO, E.S.; FURTADO, M.F.; VALENTE, R.H.; CAMARGO, A.C.M.; HO, P.L.; FOX, J.W.; SERRANO, S.M.T. Analysis of the subproteomes of proteinases and heparin-binding toxins of eight *Bothrops* venoms. **Proteomics**, v. 9, p. 733-745, 2009.
- LI, C.; LU, G.; ORTÍ, G. Optimal data partitioning and a test case for ray-finned fishes (Actinopterygii) based on ten nuclear loci. **Systematic Biology**, v. 57, n. 4, p. 519–539, 2008.
- LOEBMANN, D. Reptilia, Squamata, Serpentes, Viperidae, *Bothrops lutzi*: distribution extension, geographic distribution map. **Check List**, v. 5, n. 3, p. 373–375, 2009.
- LORENZEN, E.D.; SIMONSEN, B.T.; KAT, P.W.; ARCTANDER, P.; SIEGISMUND, H.R. Hybridization between subspecies of waterbuck (*Kobus ellipsiprymnus*) in zones of overlap with limited introgression. **Molecular Ecology**, v. 15, p. 3787– 3799, 2006.
- LOSOS, J.B. Evolution: a lizard's tale. Scientific American, março, p-64-69, 2001.
- MADDISON, W.P. Reconstructing character evolution on polytomous cladograms. **Cladistics**, v. 5, p. 365-377, 1989.
- MADDISON, W.P. Gene trees in species. Systematic Biology, v. 46, n. 3, p. 523-536, 1997.
- MADDISON, W.P.; KNOWLES, L.L. Inferring phylogeny despite incomplete lineage sorting. **Systematic Biology**, v. 55, n. 1, p. 21-30, 2006.
- MARTINS, M.; MARQUES, O.A.; SAZIMA, I. Ecological and phylogenetic correlates of feeding habits in neotropical pitvipers. In: SCHUETT, G. W.; HÖGGREN, M.; DOUGLAS, M. E.; GREENE, H. R. (Eds.). Biology of the Vipers. Utah: Eagle Mountain, 2002, p. 111-128.
- MARTINS, M.; ARAUJO, M. S.; SAWAYA, R.J.; NUNES, R. Diversity and evolution of macrohabitat use, body size and morphology in a monophyletic group of neotropical pitvipers (*Bothrops*). J. Zool. Lond., v. 254, p. 529-538, 2001.
- MAYLE, F.E. Assessment of the Neotropical dry forest refugia hypothesis in the light of palaeoecological data and vegetation model simulations. **Journal of Quartenary Science**, v. 19, n. 7, p. 713–720, 2004.

- MCDIARMID, R.W.; CAMPBELL, J.A.; TOURÉ, T.A. Snake species of the world: a taxonomic and geographical reference. (v. 1). Washington DC: The Herpetologists' League, 1999, p. 511.
- MCDOWELL,S.B. Snake systematics. In: SEIGEL, R.A.; COLLINS, J.T.; NOVAK, S.S. (Eds.). **Snakes: ecology and evolutionary biology**. New York: Macmillan, 1987, p. 3-50.
- MEBERT, K. Good species despite massive hybridization: genetic research on the contact zone between the water snakes *Nerodia sipedon* and *N. fasciata* in the Carolinas, USA. **Molecular Ecology**, v. 17, p. 1918–1929, 2008.
- METZGER, G.A.; KRAUS, F.; ALLISON, A.; PARKINSON, C.L. Uncovering cryptic diversity in *Aspidomorphus* (Serpentes: Elapidae): evidence from mitochondrial and nuclear markers. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 54, n. 2, p. 405-416, 2009.
- MILLER, K.B.; BERGSTEN, J.; WHITING, M.F. Phylogeny and classification of the tribe Hydaticini (Coleoptera: Dytiscidae): partition choice for Bayesian analysis with multiple nuclear and mitochondrial protein-coding genes. **Zoologica Scripta**, v. 38, n. 6, p. 591–615, 2009.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. SINAN Tabulação de dados (TABNET) sobre acidentes com animais peçonhentos. Brasília, DF, 2010) Disponívem em: < http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php > Acesso em: 15 jan. 2010.
- MIRANDA-RIBEIRO, A. *Lachesis lutzi*, uma variedade de *Lachesis pictus* Tschudi. **Arquivos do Museu Nacional**, Rio de Janeiro, v. 17, p. 3-4, 1915.
- MONTEIRO, C.; MONTGOMERY, C.E.; SPINA, F.; SAWAYA, R.J.; MARTINS, M. Feeding, reproduction, and morphology of *Bothrops mattogrossensis* (Serpentes, Viperidae, Crotalinae) in the Brazilian Pantanal. **Journal of Herpetology**, v. 40, n. 3, p. 408–413, 2006.
- MORITZ, C.; HILLIS, D.M. Molecular Systematics: Context and Controversies. In: HILLIS D.M.; MORITZ C.; MABLE, B.K. (eds.). **Molecular Systematics**. Massachusetts: Sinauer Associates, 1996, p. 1-13.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.
- NAGY, Z.T.; GLAW, F.; ANDREONE, F.; WINK, M.; VENCES, M. Species boundaries in Malagasy snakes of the genus *Madagascarophis* (Serpentes: Colubridae *sensu lato*) assessed by nuclear and mitochondrial markers. **Organisms**, **Diversity & Evolution**, v. 7, p. 241–251, 2007.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. GenBank. Bethesda, MD, 2009. Disponível em: http://ncbi.nlm.nih.gov/genbank Acesso em 21 mai. 2009.
- NICHOLS, R. Gene trees and species trees are not the same. Trends in Ecology and Evolution, v. 16, n. 7, p. 358-364, 2001.
- OGUIURA, N.; FERRAREZZI, H.; BATISTIC, R.F. Cytogenetics and molecular data in snakes: a phylogenetic approach. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 127, p. 128-142, 2010.

- PÄÄBO, S.; THOMAS, W.K., WHITFIELD, K.M.; KUMAZAWA, Y.; WILSON, W.K. Rearrangements of mitochondrial tranfer RNA genes in marsupials. **Journal of Molecular Evolution**, v. 33, p. 426-430, 1991.
- PARKINSON, C.L. The molecular systematics and biogeography of subfamily Crotalinae as determined by mtDNA sequences. **Copeia**, v. 3, p. 576-586, 1999.
- PARKINSON, C.L.; CHIPPINDALE, P.; CAMPBELL, J. Multigene analyses of pitviper phylogeny with comments on their biogeographical history. In: SCHUETT, G.W.; HÖGGREN, M.; DOUGLAS, M.E.; GREENE, H.W. (Eds.). Biology of the vipers. Utah: Eagle Montain, 2002, p. 93-110.
- PATTON, J.L.; DA SILVA, M.N.F.; MALCOLM, J.R. Mammals of the Rio Juruá and the evolutionary and ecological diversification of Amazonia. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 244, p. 1-306, 2000.
- PELLEGRINO, K.C.M.; RODRIGUES, M.T.; WAITE, A.N.; MORANDO M.; YASSUDA, Y.Y.; SITES JR, J.W. Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwinii* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 85, p. 13–26, 2005.
- PENNINGTON, R.T.; PRADO, D.E.; PENDRY, C.A. Neotropical seasonally dry forests and Quaternary vegetation changes. **Journal of Biogeography**, v. 27, p. 261–273, 2000.
- PESANTES, O. C. Relações entre algumas espécies do gênero *Bothrops*, pela eletroforese do plasma e morfologia do hemipênis (Serpentes: Viperidae). Dissertação (Mestrado em Zoologia). Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, SP. 1989.
- PESANTES, O.S.; FERNANDES, W. Afinidade de Bothrops erythromelas aferida através da eletroforese do plasma e da morfologia do hemipênis (Serpentes: Viperidae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, 26, 1989, João Pessoa. Livro de Resumos XVI Congresso Brasileiro de Zoologia, João Pessoa: UFPB, 1989, p. 74-75.
- PESANTES, O.S.; ABE, A.S.; FERNANDES, W. Afinidades entre Bothrops ammodytoides, B. andianus e B. pictus, aferida pela morfologia do hemipênis. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE HERPETOLOGIA, 3, 1993. Campinas. Livro de Resumos do III Congresso Latino-Americano Herpetologia. Campinas: UNICAMP, 1993, p. 173.
- PETERS, J.A.; OREJAS-MIRANDA, B. Catalogue of Neotropical Squamata: part I. snakes. U. S. Nat. Museum Bull., v. 297, 347 p., 1970.
- POSADA, D.; BUCKLEY, T.R. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike Information Criterion and bayesian approaches over likelihood ratio tests. **Systematic Biology**, v. 53, n. 5, p. 793–808, 2004.
- POSADA, D.; CRANDALL, K.A. MODELTEST: testing the modelo of DNA substitution. **Bioinformatics Applications Note**, v. 14, n. 9, p. 817-818, 1998.
- POSADA, D.; CRANDALL, K.A. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 16, n. 1, p. 37-45, 2001.
- POUGH, F.H.; GROVES, J.D. Specializations of the body form and food habits of snakes. **Am. Zool.**, v. 23, p. 443–454, 1983.

- PRADO, D.E.; GIBBS, P.E. Patterns of species distributions in the dry seasonal forests of South America. Annals of the Missouri Botanical Garden, v. 80, p. 902–927, 1993.
- PUORTO, G.; SALOMÃO, M.G.; THEAKSTON, R.D.G.; THORPE, R.S.; WARRELL, D.A.; WÜSTER, W. Combining mitochondrial DNA sequences and morphological data to infer species boundaries: phylogeography of lanceheaded pitvipers in the Brazilian Atlantic Forest, and the status of *Bothrops pradoi* (Squamata: Serpentes: Viperidae). J. Evol. Biol., v. 14, p. 527-538, 2001.
- QUEIROZ, G.P.; PESSOA, L.A.; PORTARO, F.C.V.; FURTADO, M.F.D.; TAMBOURGI, D.V. Interespecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. **Toxicon**, v. 52, p. 842-851, 2008.
- RATTER, J.A.; BRIDGEWATER, S.; RIBEIRO, J.F. Analysis of the floristic composition of the Brazilian Cerrado vegetation III: comparison of the woody vegetation of 376 areas. **Edinburgh Journal of Botany**, v. 60, n. 1, p. 57–109, 2003.
- RATTER, J.A.; RIBEIRO, J.F.; BRIDGEWATER, S. The Brazilian Cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Annals of Botany**, v. 80, p. 223-230, 1997.
- RAWLINGS, L.H.; DONNELLAN, S.C. Phylogeographic analysis of the green python, *Morelia viridis*, reveals cryptic diversity. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 27, p. 36–44, 2003.
- RIEPPEL, O. A review of the origin of snakes. **Evolutionary Biology**, v. 22, p. 37–130, 1988.
- RODRIGUES, M.T. Herpetofauna da Caatinga. In: TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C. (Eds.). **Biodiversidade, ecologia e conservação da Caatinga**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2003, p. 181-26.
- RODRIGUES, R.R. A vegetação de Piracicaba e municípios do entorno. Circular técnica IPEF, v. 189, p. 1-20, 1999.
- RODRIGUES, V.M.; SOARES, A.M.; MANCIN, A.C.; FONTES, M.R.M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; GIGLIO, J.R. Geographic variations in the composition of myotoxins from *Bothrops neuwiedi* snake venoms: biochemical characterization and biological activity. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 121A, p. 215-222, 1998.
- ROJAS, C.A.; GONÇALVES, M.R.; ALMEIDA-SANTOS, S.M. Epidemiology of snakebite in the northwestern region of the state of São Paulo, Brazil. **Rev. Bras.** Saúde Prod. An., v. 8, n. 3, p. 193-204, 2007.
- RONQUIST, E.; HUELSENBECK, J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, p.1572-1574, 2003.
- ROSEMBLUM, E.B. Convergent evolution and divergent selection: lizards at the White Sands ecotone. **The American Naturalist**, v. 167, n. 1, p. 1-15, 2006.
- RÜBER, L.; MEYER, A.; STURMBAUER, C.; VERHEYEN, E. Population structure in two sympatric species of the LakeTanganyika cichlid tribe Eretmodini: evidence for introgression. Molecular Ecology, v.10, n. 5, p. 1207-1225, 2001.
- SALOMÃO, M.G.; WÜSTER, W.; THORPE, R.S.; BBBSP. DNA evolution of South American pitvipers of the genus *Bothrops* (Reptilia: Serpentes: Viperidae). In: THORPE, R.S.; WÜSTER, W.; MALHOTRA, A. (Eds.). Venomous Snakes: ecology, evolution and snakebite. Oxford: Oxford University, 1997, p. 89-98.

- SALOMÃO, M.G.; WÜSTER, W.; THORPE, R.S.; BBBSP. MtDNA phylogeny of Neotropical pitvipers of the genus *Bothrops* (Reptilia: Serpentes: Viperidae). Kaupia, v. 8, p. 127-134, 1999.
- SANDERS, K.L.; MALHOTRA, A.; THORPE, R.S. Combining molecular, morphological and ecological data to infer species boundaries in a cryptic tropical pitviper. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 87, p. 343-364, 2006.
- SEQUEIRA,F.; ALEXANDRINO, J.; WEISS, S.; FERRAND, N. Documenting the advantages and limitations of different classes of molecular markers in a wellestablished phylogeographic context: lessons from the Iberian endemic Goldenstriped salamander, *Chioglossa lusitanica* (Caudata: Salamandridae). Biological Journal of the Linnean Society, v. 95, p. 371-387, 2008.
- SILVA, V.X. Revisão sistemática do complexo *Bothrops neuwiedi* (Serpentes, Viperidae, Crotalinae). v. 1 e 2. Tese (Doutorado em Zoologia). Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.
- SILVA, V.X. The *Bothrops neuwiedi* Complex. In: CAMPBELL, J.A.; LAMAR, W.W. (Eds.). **The venomous reptiles of the Western Hemisphere.** (v. 2) New York: Cornell University, 2004, p. 410-422.
- SILVA, V.X.; RODRIGUES, M.T. Taxonomic revision of the *Bothrops neuwiedi* complex (Serpentes, Viperidae) with description of a new species. **Phyllomedusa**, v. 7, n. 1, p. 45-90, 2008.
- SIMMONS, M.P.; PICKETT, K.M.; MIYA, M. How meaningful are bayesian support values? **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, n. 1, p. 188-199, 2004.
- SINGH, L. Evolution karyotypes in snakes. Chromosoma, v. 38, p. 185-236, 1972.
- SLOWINSKI, J.B. Molecular polytomies. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 19, n. 1, p. 114-120, 2001.
- SLOWINSKI, J.B.; LAWSON, R. Snake phylogeny: evidence from nuclear and mitochondrial genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 24, p. 194-202, 2002.
- SMOUSE, P.E. Reticulation inside the species boundary. **Journal of Classification**, v. 17, p. 165-173, 2000.
- SNEATH, P.H.A. Reticulate evolution in bacteria and other organisms: How can we study it? **Journal of Classification**, v. 17, p. 159-163, 2000.
- STAMATAKIS, A. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. **Bioinformatics**, v. 22, n. 21, p. 2688–2690, 2006.
- SUSNIK, S.; WEISS, S.; ODAK, T.; DELLING, B.; TREER, T.; SNOJ, A. Reticulate evolution: ancient introgression of the Adriatic brown trout mtDNA in softmouth trout *Salmo obtusirostris* (Teleostei: Salmonidae). **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 90, p. 139-152, 2007
- SWOFFORD, D.L. **PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), version 4.0b4a.** Massachusetts: Sinauer Associates, 2001.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. Molecular Biology and Evolution, v. 24, n. 8, p. 1596-1599, 2007.

- TERRIBILE, L.C.; OLALLA-TÁRRAGA, M. A.; MORALES-CASTILLA, I.; RUEDA, M.; VIDANES, R.M.; RODRIGUEZ, M.A.; DINIZ-FILHO, J.A.F. Global richness patterns of venomous snakes reveal contrasting influences of ecology and history in two different clades. **Oecologia**, v. 159, n. 3, p. 617-626, 2009.
- UETZ, P. The reptile database. Karlsruhe: Research Center, 2009. Disponível em: http://www.repitile-database.org. Acesso em 18 de dez. 2009.
- UNDERWOOD, G. A contribution to the classification of snakes. Brit. Mus. Nat. Hist., n. 653, p. 1-179, 1967.
- VALDUJO, P.H.; NOGUEIRA, C.; MARTINS, M. Ecology of *Bothrops neuwiedi pauloensis* (Serpentes: Viperidae: Crotalinae) in the Brazilian Cerrado. Journal of Herpetology, v. 36, n. 2, p. 169–176, 2002.
- VALLINOTO, M.; SEQUEIRA, F.; SODRÉ, D.; BERNARDI, J.A.R.; SAMPAIO I.; SCHNEIDER, H. Phylogeny and biogeography of the *Rhinella marina* species complex (Amphibia, Bufonidae) revisited: implications for Neotropical diversification hypotheses. **Zoologica Scripta**, v. 39, n. 2, p. 128-140, 2010.
- VAN OPPEN, M.J.H.; MCDONALD, B.J.; WILLIS, B.; MILLER, D.J. The evolutionary history of the coral genus *Acropora* (Scleractinia, Cnidaria) based on a mitochondrial and a nuclear marker: reticulation, incomplete lineage sorting, or morphological convergence? **Molecular Biology and Evololution**, v. 18, n. 7, p. 1315-1329, 2001.
- VANZOLINI, P.E.; RAMOS-COSTA, A.M.M.; VITT, L.J. **Répteis das Caatingas.** Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1980, 161 p.
- VIDAL, N.; HEDGES, S.B. Molecular evidence for a terrestrial origin of snakes. **Proceedings of Royal Society of London Series B,** v. 271, p. 226-229, 2004.
- VIDAL, N.; COULOUX A.; HEDGES, S.B. Molecular phylogeny, classification, and biogeography of West Indian racer snakes of the Tribe Alsophiini (Squamata, Dipsadidae, Xenodontinae). **Zootaxa**, v. 2067, p. 1-28, 2009.
- VIDAL, N.; DELMAS, A.S.; DAVID, P.; CRUAUD, C.; COULOUX, A.; HEDGES, S.B. The phylogeny and classification of caenophidian snakes inferred from seven nuclear protei-coding genes. **C. R. Biologies**, v. 330, p. 182-187, 2007.
- VOLLMER, S.V.; PALUMBI, S.R. Hybridization and the evolution of reef coral diversity. **Science**, v. 296, p. 2023 2025, 2002.
- WAGLER, J. Serpentum Brasiliensium species novae ou Histoire Naturelle des espècies de serpens, recueillies et observées pendant le Voyage dans l'intérieur du Brésil dans lês annés 1817, 1818, 1819, 1820 executé par odre de as Majesté le Roi de Bavière. In: SPIX, J (Ed.). Animalia nova sive species novae. Monaco: Typis Franc. Seraph. Hübshmanni, 1824, p. 1-75.
- WARRELL, D.A. Snakebites in Central and South America: epidemiology, clinical features, and clinical management In: CAMPBELL, J.A.; LAMAR, W.W. (Eds.).
 The Venomous reptiles of the Western Hemisphere. New York: Cornell University, 2004, p. 709-761.
- WECKSTEIN, J.D.; ZINK, R.M.; BLACKWELL-RAGO, R.C.; NELSON, D.A. Anomalous variation in mitochondrial genomes of white-crowned (*Zonotrichia leucophrys*) and golden-crowned (*Z. atricapilla*) sparrows: pseudogenes, hybridization, or incomplete lineage sorting? Auk, v. 118, p. 231-236, 2001.
- WEISROCK, D.W.; KOZAK, K.H.; LARSON, A. Phylogeographic analysis of mitochondrial gene flow and introgression in the salamander *Plethodon shermani*. **Molecular Ecology**, v 14, p. 1457 1472, 2005.
- WERMAN, S.D. Phylogenetic relationships of Central and South American pitvipers of the genus *Bothrops* (*sensu lato*): cladistics analyses of biochemical and anatomical characters. In: CAMPBELL, J.A.; BRODIE JR., E.D. (Eds.). **Biology** of the pitvipers. Texas: Selva, 1992, p. 21-40.
- WEST-EBERHARD, M.J. Phenotypic plasticity and the origins of diversity. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 20, p.249-278, 1989.
- WHEELER, W.C.; ARANGO, C.P.; GRANT, T.; JANIES, D.; VARÓN, A.; AAGESEN,
 L.; FAIVOVICH, J.; D'HAESE, C.; SMITH, W.L.; GIRIBET, G. Dynamic homology and phylogenetic sistematics: a unified approach using POY.
 New York: American Museum of Natural History, 2006, 365 p.
- WIENS, J.J.; PENKROT, T.A. Delimiting species using DNA and morphological variation and discordant species limits in spiny lizards (*Sceloporus*). Systematic Biology, v. 51, n. 1, p. 69-91, 2002.
- WIENS, J.J; KUCZYNSKI, C.A.; SMITH, S.A.; MULCAHY; D.G.; SITES JR., J.W.; TOWNSEND, T.M.; REEDER, T.W. Branch lengths, support, and congruence: testing the phylogenomic approach with 20 nuclear loci in snakes. Systematic Biology, v. 57, n. 3, p. 420-431, 2008.
- WILLYARD, A.; CRONN, R.; LISTON, A. Reticulate evolution and incomplete lineage sorting among the ponderosa pines. Molecular Phylogenetics and Evolution, v. 52, p. 498-511, 2008.
- WÜSTER, W.; DUARTE, R.D.; SALOMÃO, M.G. Morphological correlates of incipient arboreality and ornithophagy in island pitvipers, and the phylogenetic positions of *Bothrops insularis.* J. Zool. Lond., v. 266, p. 1-10, 2005a.
- WÜSTER, W.; PEPPIN, L.; POOK, C.E.; WALKER, D.E. A nesting of vipers: phylogeny and historical biogeography of the Viperidae (Squamata: Sepentes). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 49, p. 445- 459, 2008.
- WÜSTER, W.; SALOMÃO, M.G.; DUCKETT, G.J.; THORPE, R.S.; BBBSP. Mitochondrial DNA phylogeny of *Bothrops atrox* complex (Squamata: Serpentes: Viperidae). **Kaupia**, v. 8, p. 135-144, 1999.
- WÜSTER, W.; SALOMÃO, M.G.; QÜIJADAS-MASCAREÑAS, J.A.; THORPE, R.S.; BBBSP. Origin and evolution of South America pitviper fauna: evidence from mitochondrial DNA sequence analysis. In: SCHUETT, G.W.; HÖGGREN, M.; DOUGLAS, M.E.; GREENE, H.R. (Eds.). Biology of the Vipers. Utah: Eagle Mountain, 2002a, p. 111-128.
- WÜSTER, W.; FERGUSON, J.E.; QUIJADA-MASCAREÑAS, J. A.; POOK, C.E.; SALOMÃO, M.G.; THORPE, R.S.Tracing an invasion: landbridges, refugia, and the phylogeography of the Neotropical rattlesnake (Serpentes: Viperidae: *Crotalus durissus*). **Molecular Ecology**, v. 14, p. 1095-1108, 2005b.
- WÜSTER, W.; THORPE, R.S.; SALOMÃO, M.G.; THOMAS, L.; PUORTO, G.; THEAKSTON, R.D.G.; WARRELL, D.A. Origin and phylogenetic position of the Lesser Antilean species of *Bothrops* (Serpentes, Viperidae): biogeographical and medical implications. **Bull. Nat. Hist. Mus. Lond. Zool.**, v. 68, n. 2, p. 101-106, 2002b.

- WÜSTER, W.; SALOMÃO, M.G.; THORPE, R.S.; PUORTO, G.; FURTADO, M.F.D.; HOGE, S.A.; THEAKSTON, R.D.G.; WARRELL, D.A. Systematics of the *Bothrops atrox* complex: new insights from multivariate analysis and mitochondrial DNA sequence information. In: THORPE, R. S.; WÜSTER,W.; MALHOTRA, A. (Eds.). Venomous snakes: ecology, evolution and snakebite. Oxford: Oxford University, 1997, p. 99-113.
- WÜSTER, W.; ALLUM, C.S.E.; BJARGARDÓTTIR, B.; BAILEY, K.L.; DAWSON, K.J.; GUENIOUI, J.; LEWIS, J.; MCGURK, J.; MOORES, A.G.; NISKANEN, M.; POLLARD, C.P. Do aposematism and Batesian mimicry require bright colours? A test, using European viper markings. **Proceedings of Royal Society of London Series B**, v. 271, p. 2495-2499, 2004.
- YONEYAMA, Y. The nucleotide sequences of the heavy and light strand replication origins of the *Rana catesbiana* mitochondrial genome. **J. Nippon Med. Sch.**, v. 54, p. 429-440, 1987.
- ZAHER, H.; GRAZZIOTIN, F.G.; CADLE, J.E.; MURPHY, R.W.; MOURA-LEITE, C.; BONATTO, S.L. Molecular phylogeny of advanced snakes (Serpentes, Caenophidia) with an emphasis on South American Xenodontines: a revised classification and descriptions of new taxa. **Papéis avulsos de Zoologia**, v. 49, p. 115-153, 2009.
- ZAMUDIO, K.; GREENE, H. Phylogeography of the bushmaster (*Lachesis muta*: Viperidae): implications for neotropical biogeography, sistematics and conservation. Biological Journal of the Linnean Society, v. 62, p. 421-442, 1997.

Anexo 1. Listagem das sequências retiradas do GenBank e utilizadas na análise inicial: espécie, número de acesso, número do *voucher* e referência.

Espécie	Localidade	cyt b	ND4	Voucher	Referência
Agkistrodon piscivorus	Estados Unidos, Carolina do Sul		AF156578	CLP30	Parkinson et al., 2000
Bothriopsis bilineata	Equador, Morona Santiago, Macuma	AF292592	AF292630	FHGO 983	Wüster <i>et al.</i> , 2002a
Bothriopsis chloromela	Peru, Dept. Pasco	DQ305471	DQ305488	LSUMZ 41037	Castoe & Parkinson, 2006
Bothriopsis pulchra Bothrops punctatus	Equador, Estación Cientifica San Francisco, Zamora Chinchipe Equador, Pedro Vicente Maldonado, Pichincha	AF292593 AF292594	AF292631 AF292632	FHGO coleção viva 2142 FHGO coleção viva 2166	Wüster <i>et al.</i> , 2002a Wüster, não publicado
Bothiropsis taeniata	Suriname	AY223592	AY223637	sem voucher	Parkinson <i>et al.</i> , 1999
Bothrocophias hyoprora	Equador, Morona Santiago, Macuma	AF292576	AF292614	FHGO 4005	Wüster <i>et al.</i> , 2002a
Bothrocophias microphthalmus	Equador, Zamora Chinchipe, Cuenca del Rio Jamboe	AF292577	AF292615	FHGO 2566	Wüster <i>et al.</i> , 2002a
Bothrocophias campbelli	Ecuador, Chimborazo, Pallatanga	AF292584	AF191582	INHMT, não catalogado	Wüster <i>et al.</i> , 2002a
Bothrops alcatraz	Ilha de Alcatrazes, SP	AY865820		CBGM-baz001	Grazziottin et al., 2006
Bothrops alternatus	Itirapina,SP	EU867275	EU867287	ITS358	Fenwick et al., 2009
Bothrops ammodytoides	Argentina, Prov. Neuguen	AY223595	AY223639	MVZ 223514	Parkinson <i>et al.</i> , 2002
Bothrops asper	Belize, Coleção do Zoológico	AF292600	AF292638	coleção viva	Wüster <i>et al.</i> , 2002a
Bothrops atrox	Sem localidade	AF292604	AF292642	FHGO coleção viva 1424	Wüster, não publicado
Bothrops brazili	Venezuela, Amazonia	EU867276	EU867288	USNM_RWM17831	Fenwick et al., 2009
Bothrops caribbaeus	Santa Lúcia	AF292598	AF292636	solto após amostragem	Wüster <i>et al.</i> , 2002a
Bothrops diporus	Argentina, Castro Barros, La Rioja	DQ305472	DQ305489	PT3404	Castoe & Parkinson, 2006
Bothrops diporus	Blumenau, SC	AF292587	AF292625	IB 60327	Wüster,W. unpublishe d
Bothrops erythromelas	Guanambi, BA	AF292588	AF292626	IB 55541	Wüster <i>et al.</i> , 2002a
Bothrops erythromelas	Piranhas, AL	AY223600	U41877	RG 829	Parkinson et al., 2002
Bothrops fonsecai	Campos do Jordão, SP	AF292580	AF292618	IB 55543	Wüster <i>et al.</i> , 2002a
Bothrops insularis	Ilha da Queimada Grande, SP	AF292590	AF292628	solta após amostragem	Wüster <i>et al.</i> , 2002a
Bothrops isabelae	Venezuela Guanare, Portuguesa	AF292603	AF292641	solto após amostragem	Wüster, não publicado
Bothrops itapetiningae	Itirapina, SP	EU867277	EU867289	ITS427	Fenwick et al., 2009
Bothrops jararaca	Piraquara, PR	AY122857	AY122864	sem voucher	Wüster <i>et al.</i> , 2005
Bothrops jararacussu	Cananéia, SP	AF292596	AF292634	IB 55313	Wüster <i>et al.</i> , 2002a
Bothrops lanceolatus	Martinica	AF292599	AF292637	sem voucher	Wüster <i>et al.</i> , 2002a
Bothrops leucurus	Sem localidade	EU867279	EU867291	CLP195	Fenwick <i>et al.</i> , 2009

Espécie	Localidade	cyt <i>b</i>	ND4	Voucher	Referência
Bothrops marajoensis	Ilha de Marajó, PA	AF292605	AF292643	solto após amostragem	Wüster <i>et al.</i> , 2002
Bothrops marmoratus	Minaçu, GO	AF292624		IB57513	Wüster, não publicado
Bothrops moojeni	Itirapina, SP	EU867280	EU867292	ITS406	Fenwick et al., 2009
Bothrops osbornei	Sem localidade	AF292595	AF292633	FHGO coleção viva 2166	Wüster <i>et al</i> ., 2002a
Bothrops pauloensis	Sem localidade	EU867284	EU867296	CLP3	Fenwick et al., 2009
Bothrops pictus	Peru, Pullo, Aycucho	AF292583	AF292621	Coleção de O. Pesantes	Wüster <i>et al.</i> , 2002a
Cerrophidion goodmani	Sem localidade	AY220325	AY220348	UTAR40008	Castoe & Parkinson, 2006
Crotalus durissus durissus	Costa Rica, Baia de Pájaros, Puntarena	AY704835	AY704885	1097	Wüster <i>et al.</i> , 2005
Lachesis muta	Peru		AY223644	Cadle 135	Parkinson et al., 2002
Lachesis stenophrys	Costa Rica, Bri-Bri, Chiroles		U96026	Cadle 135	Zamudio & Greene, 1997
Ophryacus undulatus	México		AY223633	CLP73	Parkinson <i>et al.</i> , 2002
Porthidium dunni	México	AY223581	AY223630	ENS9705	Parkinson <i>et al.</i> , 2002
Porthidium arcoasae	Equador	AY223582	AY223631	WWW-750	Parkinson <i>et al.</i> , 2002
Sistrurus miliarius	Sem localidade		SMU41889		Kraus <i>et al.</i> , 1996

Anexo 2. Valores mínimos e máximos das distâncias genéticas corrigidas pelo modelo K2P, calculados para os clados recuperados nas inferências filogenéticas das espécies do grupo *neuwiedi*, com base em 378 pb do gene mitocondrial citocromo *b*. Em negrito estão destacadas as distâncias intraespecíficas.

	Clado C	Clado D	Clado L	Clado M	Clado N	Clado I	Clado J	Clado R	Clado S
Porthidium nasutum	0,197 - 0,204	0,175 - 0,186	0,215 - 0,218	0,207 - 0,215	0,186 - 0,200	0,178 - 0,207	0,171 - 0,197	0,181 - 0,211	0,189 - 0,193
Bothrocophias hyoprora	0,136 - 0,153	0,126 - 0,131	0,127 - 0,135	0,131 - 0,135	0,130 - 0,142	0,119 - 0,139	0,123 - 0,140	0,122 - 0,135	0,126 - 0,127
Bothrops alternatus	0,115 - 0,131	0,098 - 0,106	0,116 - 0,121	0,108 - 0,112	0,110 - 0,122	0,104 - 0,116	0,099 - 0,122	0,102 - 0,114	0,106 - 0,110
Bothrops atrox	0,134 - 0,138	0,114 - 0,134	0,157 - 0,161	0,143 - 0,147	0,127 - 0,137	0,143 - 0,157	0,124 - 0,144	0,111 - 0,130	0,117 - 0,127
Bothriopsis bilineata	0,104 - 0,112	0,081 - 0,103	0,110 - 0,114	0,094 - 0,094	0,100 - 0,112	0,076 - 0,096	0,100 - 0,124	0,092 - 0,104	0,096 - 0,103
Bothrops jararaca	0,089 - 0,097	0,081 - 0,089	0,111 - 0,115	0,099 - 0,103	0,089 - 0,109	0,080 - 0,099	0,090 - 0,117	0,074 - 0,085	0,078 - 0,085
Bothrops insularis	0,089 - 0,096	0,072 - 0,080	0,094 - 0,098	0,090 - 0,094	0,080 - 0,092	0,072 - 0,090	0,081 - 0,100	0,065 - 0,077	0,069 - 0,077
Clado C	0 - 0,035	0,049 - 0,067	0,085 - 0,095	0,079 - 0,092	0,067 - 0,077	0,067 - 0,086	0,067 - 0,083	0,063 - 0,085	0,070 - 0,079
Clado D		0 - 0,024	0,061 - 0,076	0,058 - 0,070	0,044 - 0,061	0,049 - 0,078	0,052 - 0,073	0,044 - 0,064	0,049 - 0,061
Clado L			0 - 0,01	0,016 - 0,018	0,067 - 0,094	0,038 - 0,053	0,071 - 0,101	0,068 - 0,091	0,073 - 0,079
Clado M				0 - 0,005	0,061 - 0,073	0,032 - 0,049	0,068 - 0,091	0,064 - 0,088	0,067 - 0,076
Clado N					0 – 0,013	0,055 - 0,072	0,050 - 0,069	0,021 - 0,043	0,021 - 0,032
Clado I						0 - 0,018	0,072 - 0,107	0,047 - 0,085	0,055 - 0,072
Clado J							0 - 0,024	0,049 - 0,073	0,052 - 0,079
Clado R								0 - 0,024	0,009 - 0,027
Clado S									0 - 0,010