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 01
1.1. Ordem Squamata 01
1.2. Família Viperidae, Subfamília Crotalinae 02
1.3. Gênero *Bothrops sensu stricto* 04
1.4. Grupo *Bothrops neuwiedi* 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 82
7. Resumo 85
8. *Abstract* 86
9. Referências Bibliográficas 87

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 & Parkinson, 2006; 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 quatro 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 escamas 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 *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.

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.

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	8430
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 táxons válidos 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)	Manchas dorsais de bordas bem marcadas e presença de manchas intercalares entre as manchas principais
B. mattogrossensis (Amaral, 1925)	*B. n. mattogrossensis* (Amaral, 1925) *B. n. boliviana* (Amaral, 1927), *B. n. bolivianus* (Hoge, 1966)	
B. pubescens (Cope, 1870)	*Trigonocephalus pubescens* (Cope, 1870), *B. n. riograndensis* (Amaral, 1925), *B. n. pubescens* (Hoge, 1959, 1966)	
B. diporus (Cope, 1862)	*B. n. meridionalis* (Amaral, 1930), *B. n. diporus* (Cochran, 1961; Hoge, 1966)	
B. pauloensis (Amaral, 1925)	*B. n. pauloensis* (Amaral, 1925)	Manchas dorsais de bordas difusas e manchas intercalares ausentes ou pouco nítidas
B. lutzi (Miranda-Ribeiro, 1915)	*Lachesis lutzi* (Miranda-Ribeiro, 1915), *B. n. bahiensis* (Amaral, 1925), *B. n. lutzi* (Amaral, 1930; Hoge, 1966) *B. n. piauhyensis* (Amaral, 1925) *B. iglesiasi* (Amaral, 1923)	
B. marmoratus (Silva & Rodrigues, 2008)	-	

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*	-		X		X	X	X
	B. lutzi		-		X	X	X	
	B. mattogrossensis	X		-		X	X	
	B. marmoratus		X		-	X	X	
	B. neuwiedi	X	X	X	X	-	X	
	B. pauloensis	X	X	X	X	X	-	
	B. pubescens	X						-
Ocorrência de Simpatria	*B. diporus*	-						
	B. lutzi		-					
	B. mattogrossensis		1	-				
	B. marmoratus				-			
	B. neuwiedi				2	-		
	B. pauloensis		1	9	3	12	-	
	B. pubescens	1						-

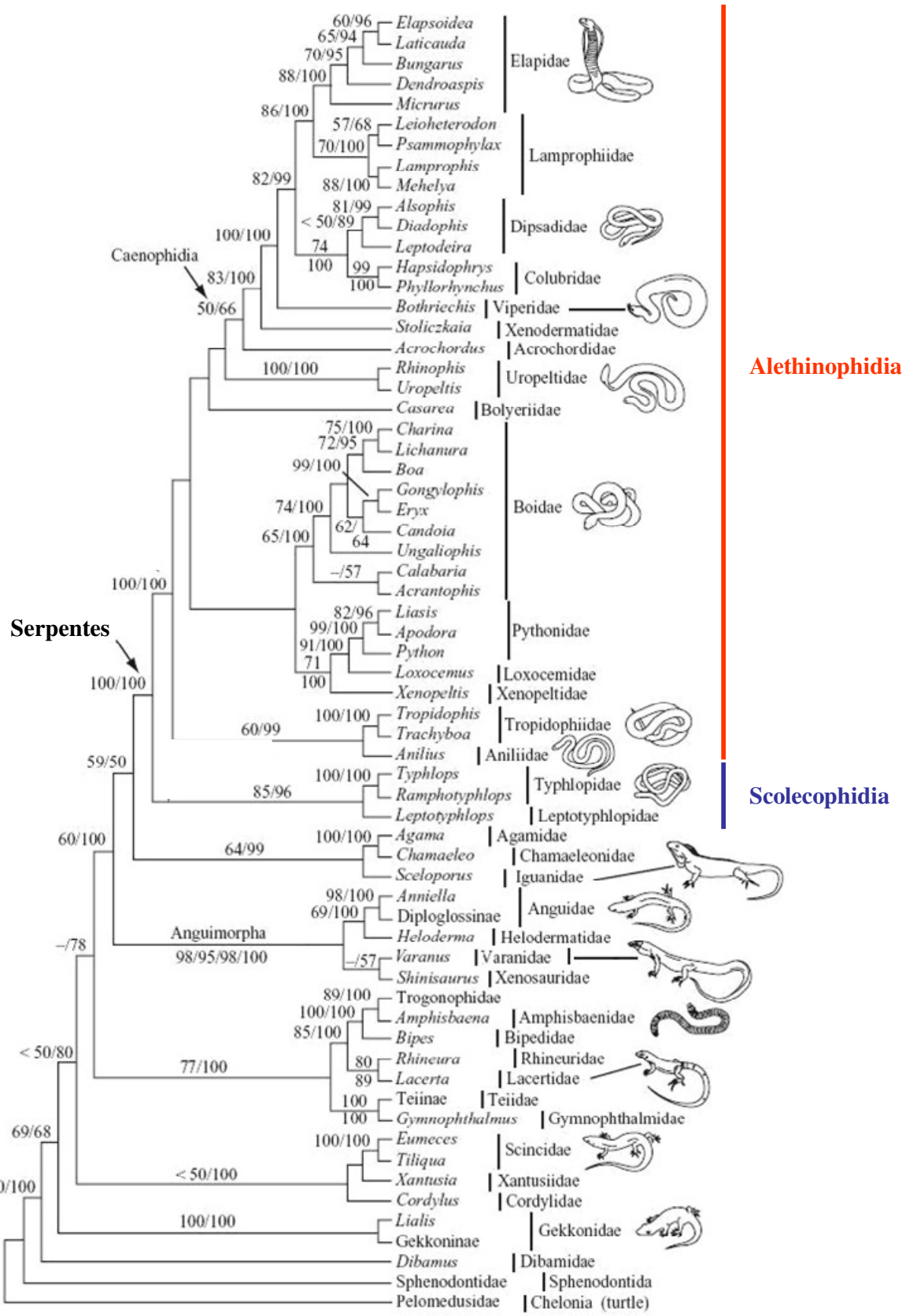

Figura 1. Relações filogenéticas da Ordem Squamata baseadas em sequências dos genes nucleares *Rag1* (gene de ativação de recombinação 1) e c-*Mos* (proto-oncogene do sarcoma de Moloney) (Vidal & Hedges, 2004). Em destaque, as infraordens Scolecophidia (em azul) e Alethinophidia (em vermelho), que compõem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

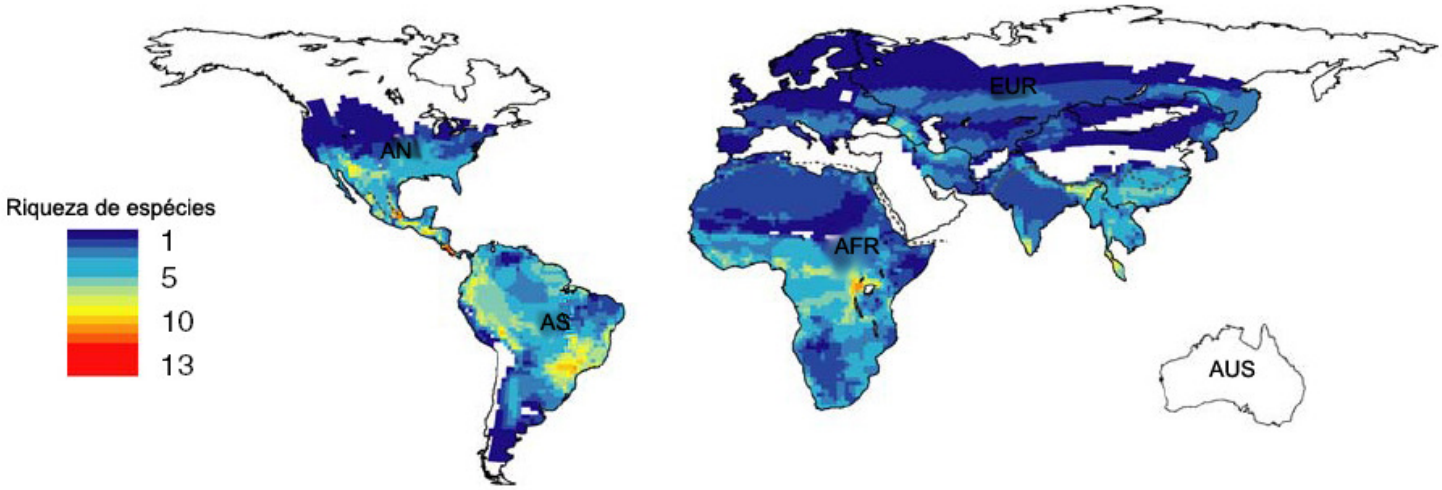

Figura 2. Distribuição de viperídeos, com destaque para a riqueza de espécies, segundo Terribile *et al*. (2009).

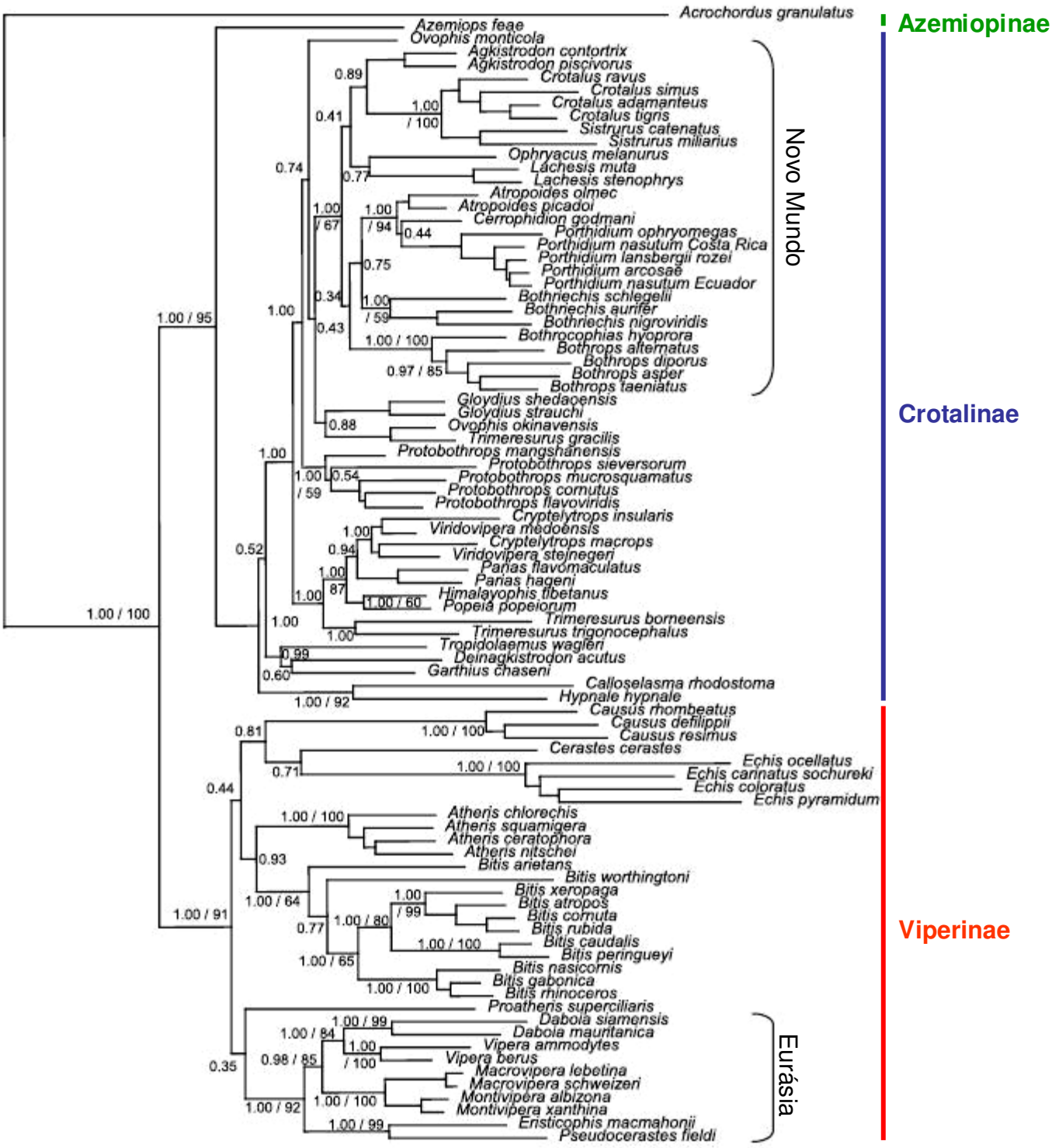

Figura 3. Relações filogenéticas entre membros da família Viperidae baseadas em sequências de genes mitocondriais (cyt *b*, ND4, 12S e 16S). Árvore parcial de inferência bayesiana retirada de Wüster *et al.* (2008).

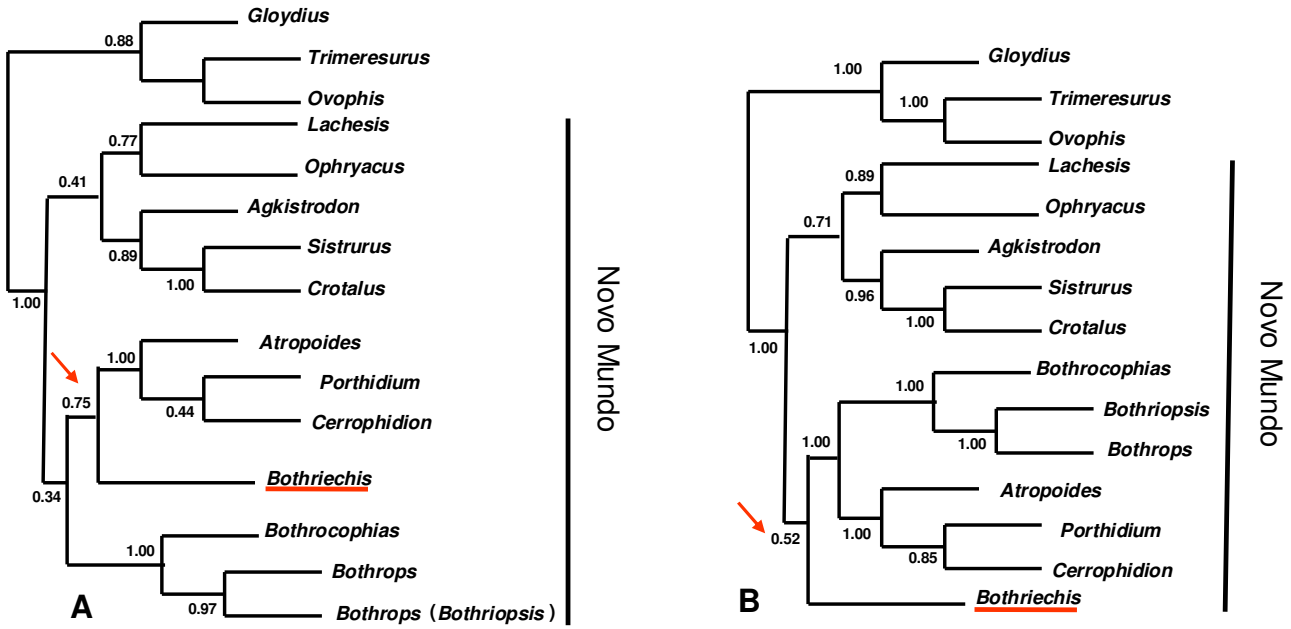

Figura 4. Relações filogenéticas da Subfamília Crotaline para os gêneros que ocorrem no continente americano. Árvores de inferência bayesiana baseadas em sequências do cyt *b*, 12S, 16S e ND4 do DNA mitocondrial, adaptadas das propostas de: **(A)** Wüster *et al*. (2008) e **(B)** Castoe *et al*. (2009).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

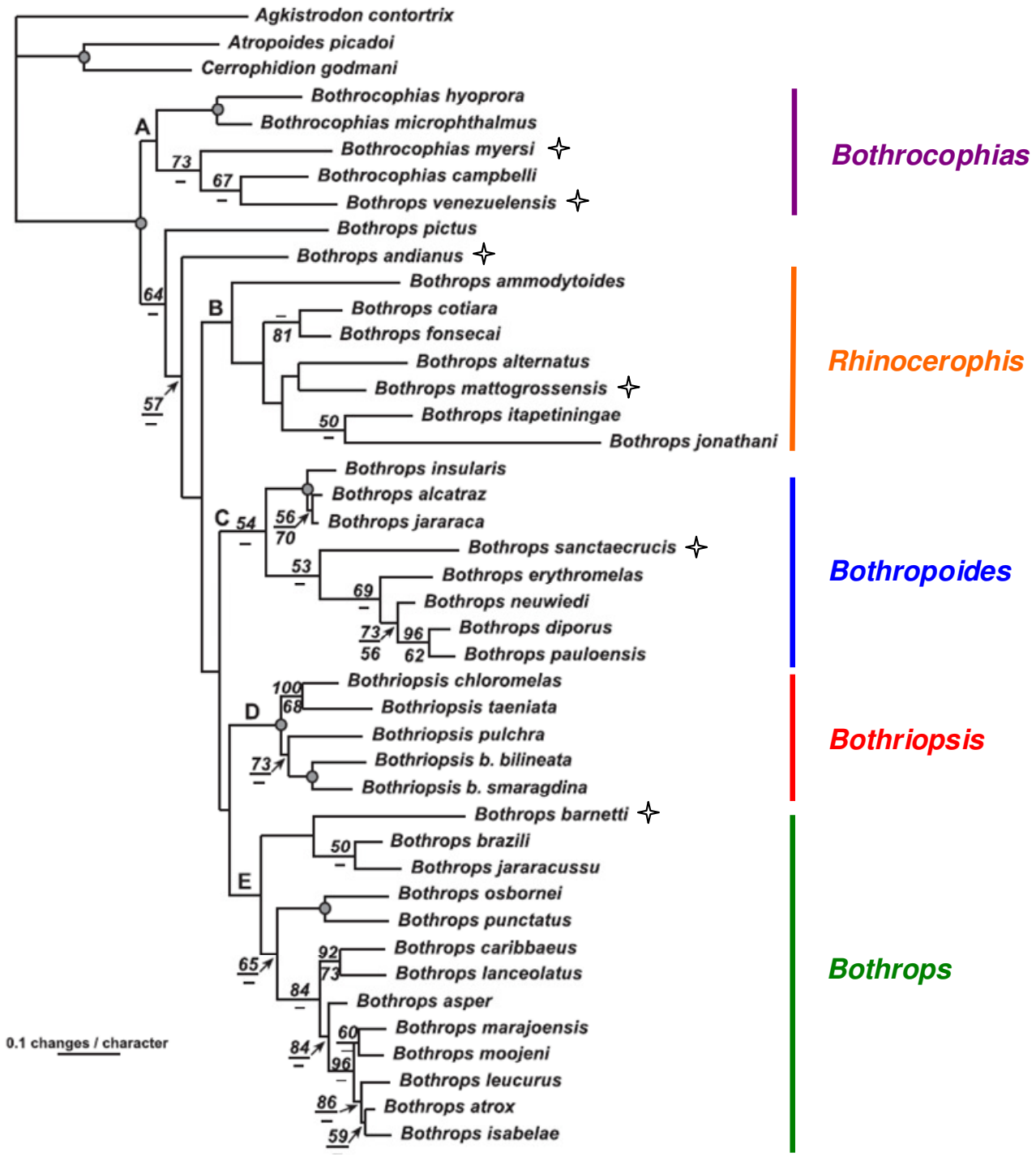

Figura 5. Relações filogenéticas propostas por Fenwick *et al.* (2009). Filograma de consenso de 50% a partir de inferência bayesiana obtida de sequências de DNA mitocondrial (cyt *b*, 12S, 16S e ND4) e caracteres morfológicos. Em destaque os novos gêneros propostos; os táxons recuperados em locais alternativos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

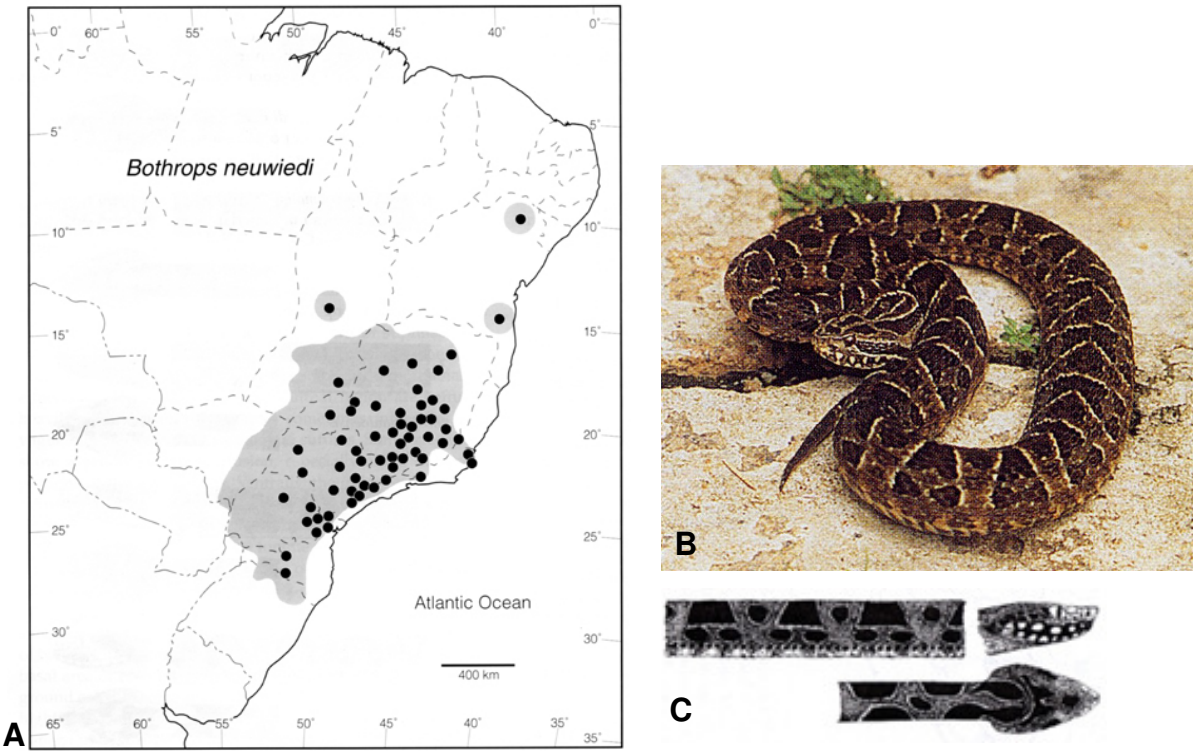

Figura 6. *Bothrops neuwiedi.* **(A)** Distribuição geográfica (Silva, 2004). **(B)** Exemplar de Irati, Paraná (foto de Nelson Jorge da Silva, retirada de Campbell & Lamar, 2004). **(C)** Padrão de manchas da espécie (Silva, 2004; Silva & Rodrigues, 2008).

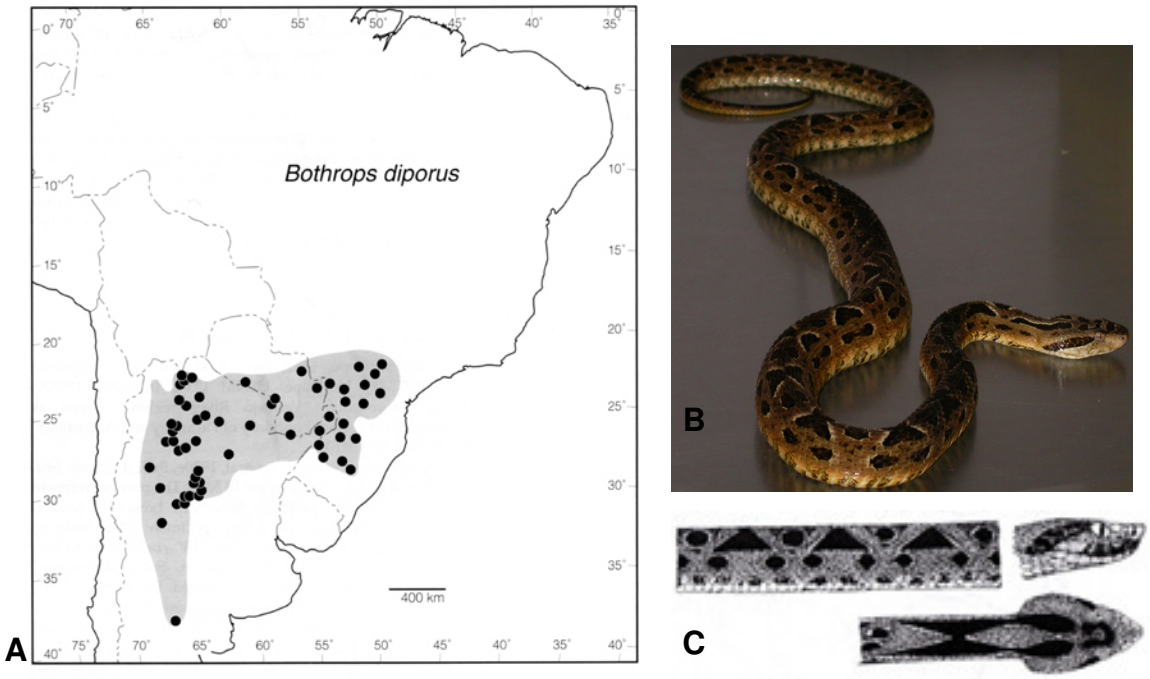

Figura 7. *Bothrops diporus.* **(A)** Distribuição geográfica (Silva, 2004). **(B)** Exemplar de Tucunduva, Rio Grande do Sul (foto de Taís Machado). **(C)** Padrão de manchas da espécie (Silva, 2004; Silva & Rodrigues, 2008).

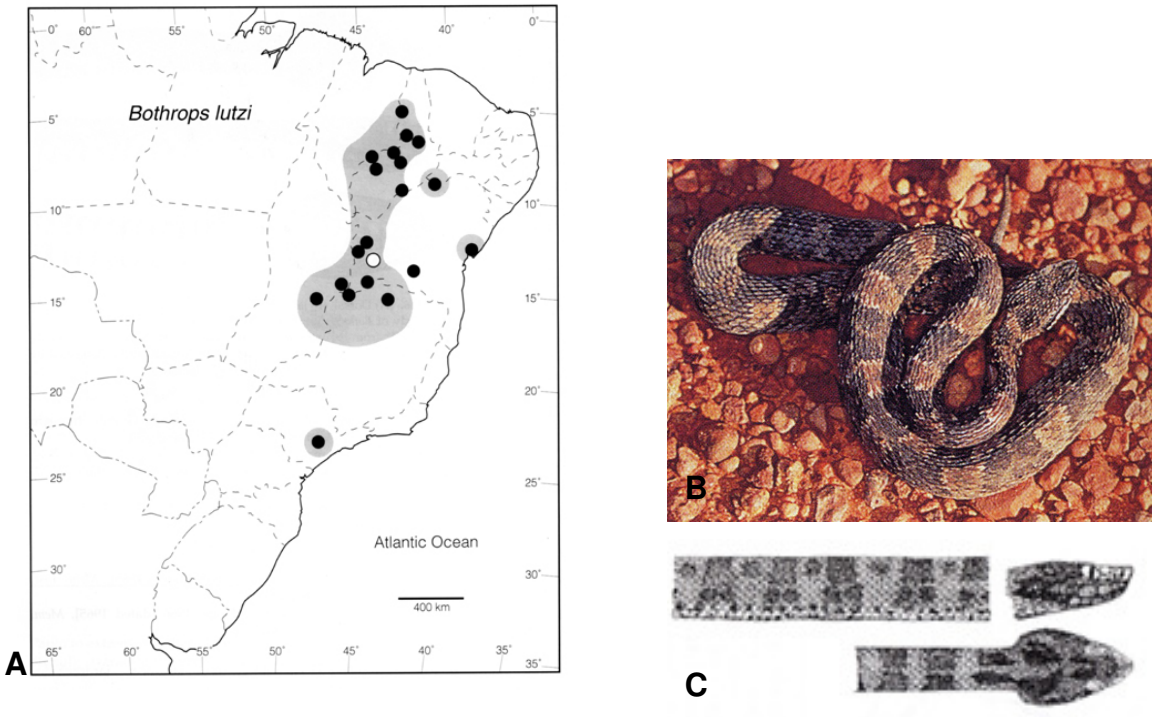

Figura 8. *Bothrops lutzi.* **(A)** Distribuição geográfica (Silva, 2004). **(B)** Exemplar de Uruçui-Una, Piauí (foto de Miguel T. Rodrigues retirada de Campbell & Lamar, 2004). **(C)** Padrão de manchas da espécie (Silva, 2004; Silva & Rodrigues, 2008).

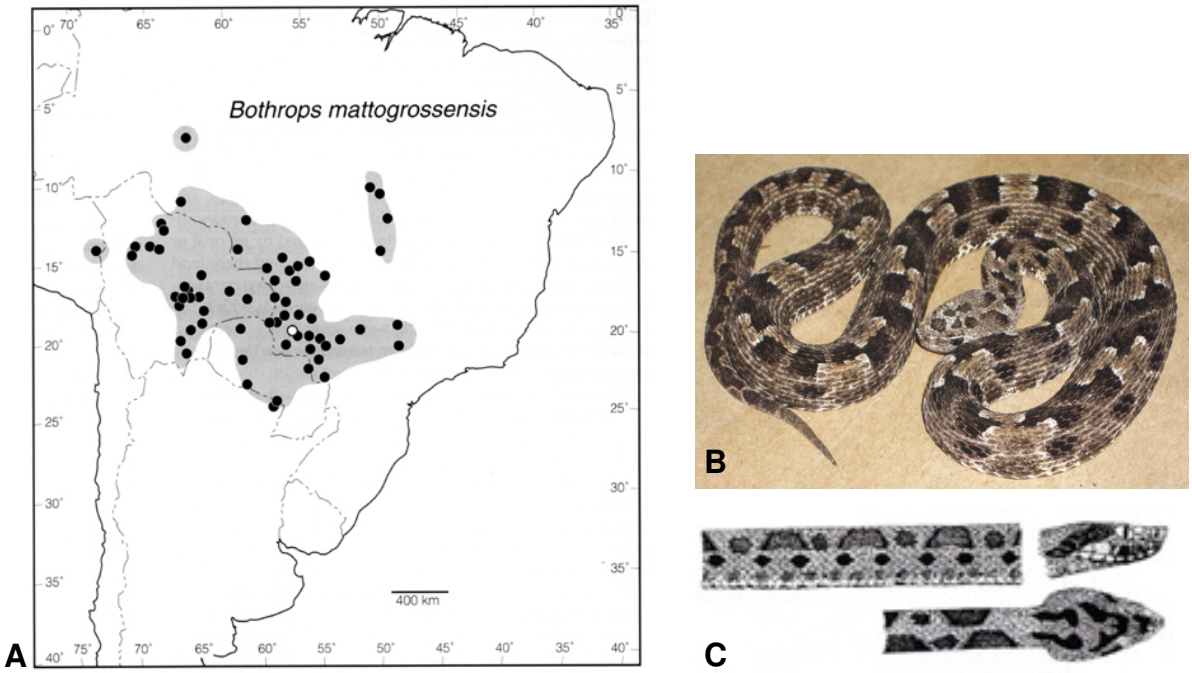

Figura 9. *Bothrops mattogrossensis.* **(A)** Distribuição geográfica (Silva, 2004). **(B)** Exemplar da Chapada dos Guimarães, Mato Grosso (foto de Christine Strüssmann). **(C)** Padrão de manchas da espécie (Silva, 2004; Silva & Rodrigues, 2008).

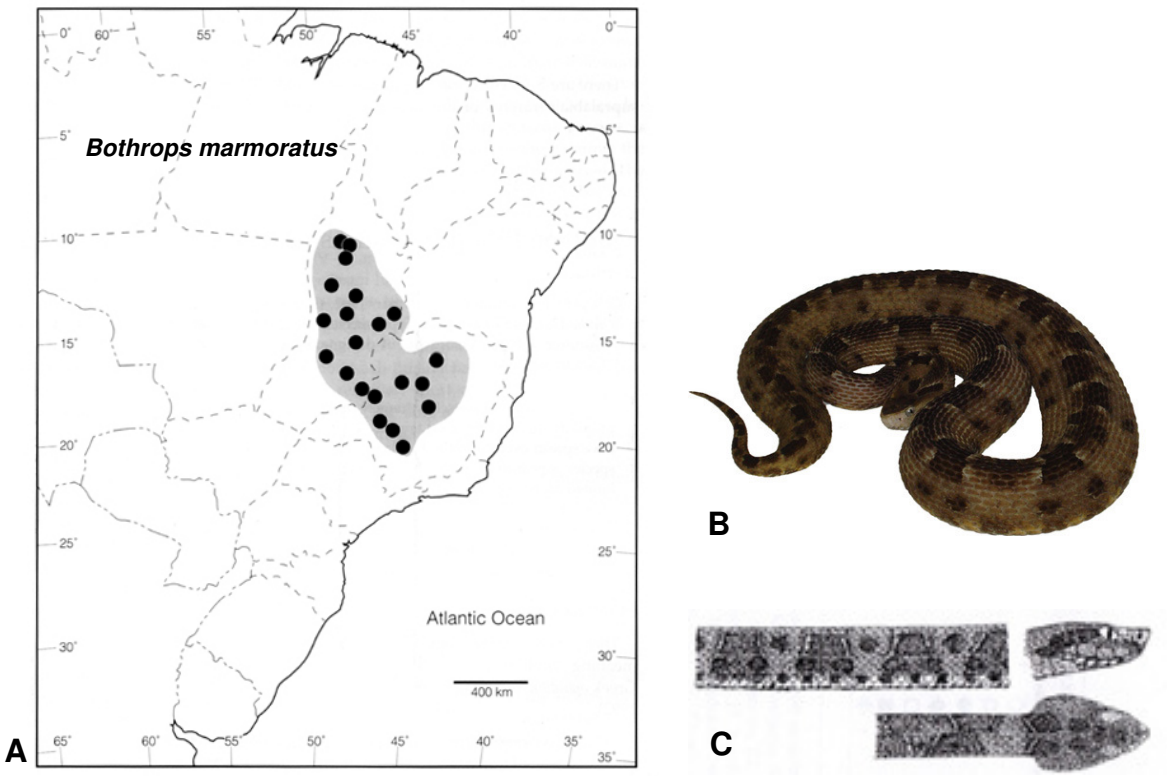

Figura 10. *Bothrops marmoratus.* **(A)** Distribuição geográfica (Silva, 2004). **(B)** Exemplar de Leopoldo de Bulhões, Goiás (foto de Marta Magalhães). **(C)** Padrão de manchas da espécie (Silva, 2004; Silva & Rodrigues, 2008).

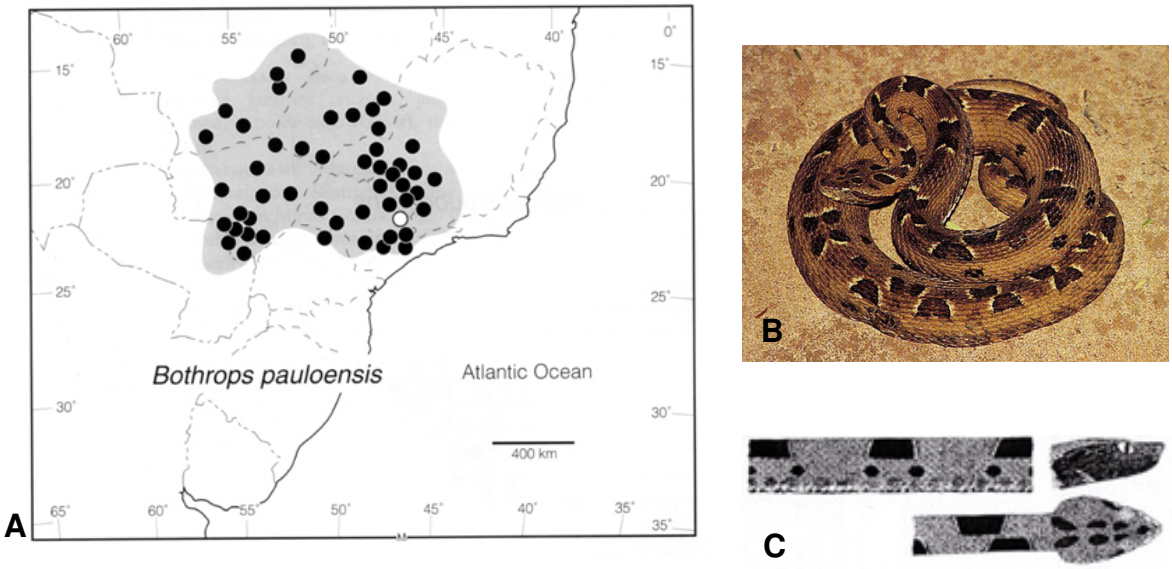

Figura 11. *Bothrops pauloensis.* **(A)** Distribuição geográfica (Silva, 2004). **(B)** Exemplar de Avaré, São Paulo (foto de Ivan Sazima retirada de Campbell & Lamar, 2004). **(C)** Padrão de manchas da espécie (Silva, 2004; Silva & Rodrigues, 2008).

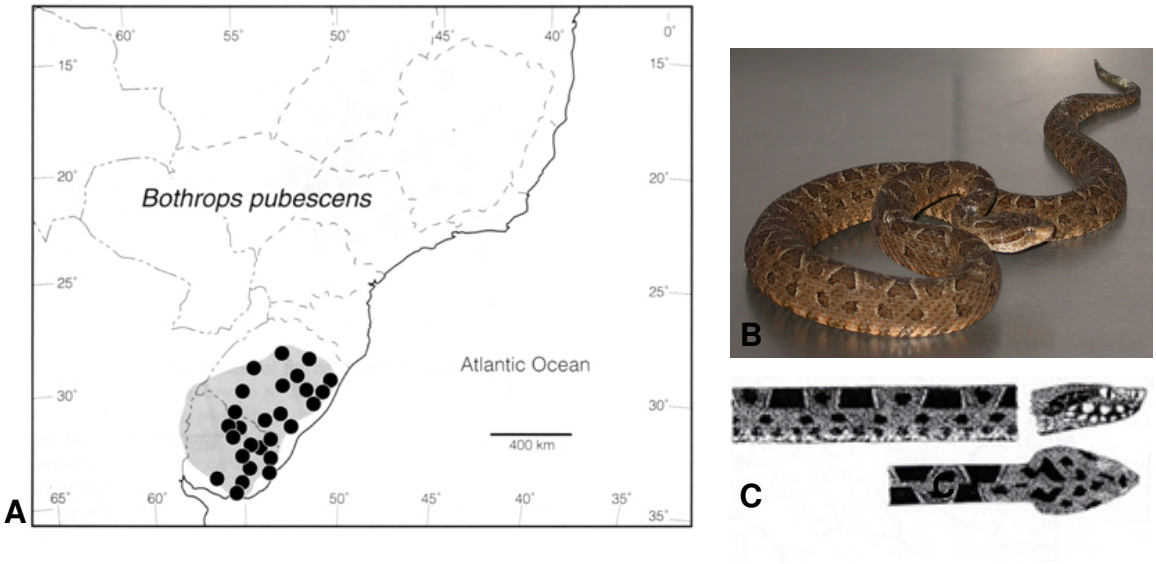

Figura 12. *Bothrops pubescens.* **(A)** Distribuição geográfica (Silva, 2004). **(B)** Exemplar de Barra do Ribeiro, Rio Grande do Sul (foto de Taís Machado). **(C)** Padrão de manchas da espécie (Silva, 2004; Silva & Rodrigues, 2008).

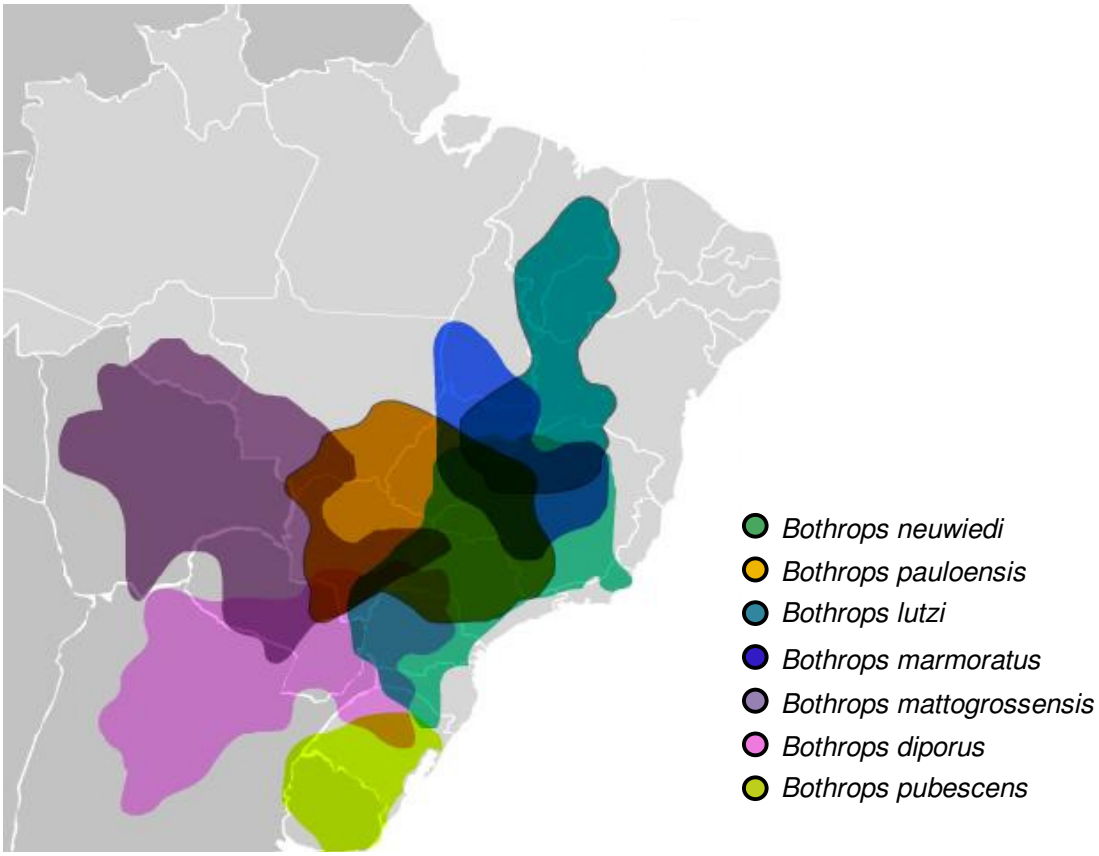

Figura 13. Mapa com a sobreposição das distribuições geográficas das espécies do grupo *neuwiedi*, compilado a partir de Silva (2004).

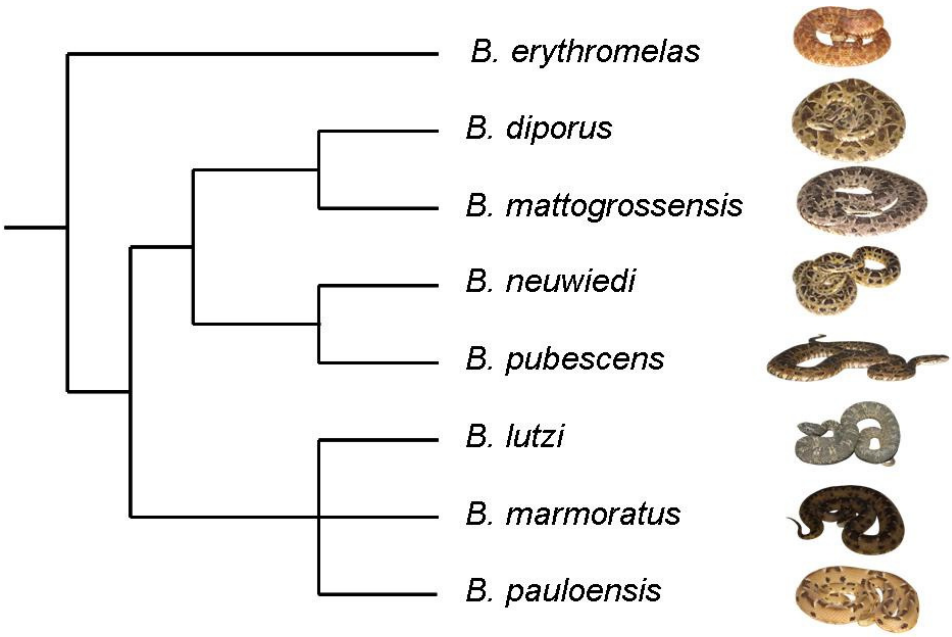

Figura 14. Árvore de parcimônia baseada em dados morfológicos de *Bothrops* do grupo *neuwiedi* (Silva, 2000), com modificações.

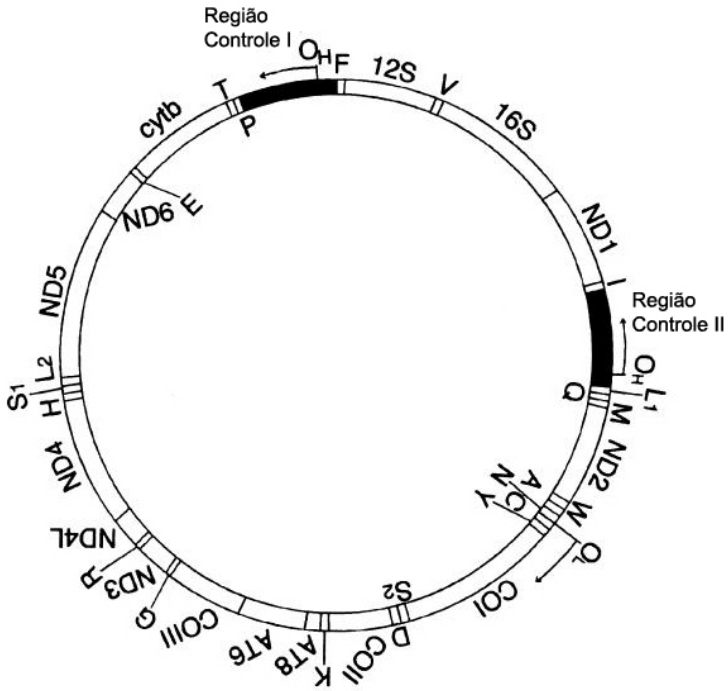

Figura 15. Molécula de DNA mitocondrial típica de serpentes, com a região controle duplicada (Dong & Kumazawa, 2005).

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:

<http://www.estadao.com.br/estadaodehoje/20100516/not_imp552413,0.php>
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: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles> 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 well-established phylogeographic context: lessons from the Iberian endemic Golden-striped 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 observèes 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.