
Taís Machado

Filogenia e Filogeografia do grupo *Bothrops neuwiedi*
(Serpentes, Squamata)

Phylogeny and phylogeography of the *Bothrops neuwiedi*
group (Serpentes, Squamata)

São Paulo

2015

Taís Machado

Filogenia e Filogeografia do grupo *Bothrops neuwiedi*
(Serpentes, Squamata)

Phylogeny and phylogeography of the *Bothrops neuwiedi*
group (Serpentes, Squamata)

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

Orientador(a): Dra. Maria José de Jesus Silva
Co-orientador: Dr. Vinícius Xavier Silva

São Paulo

2015

Ficha Catalográfica

Machado, Taís
Filogenia e Filogeografia do grupo
Bothrops neuwiedi (Serpentes, Squamata)

183 p.

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

1. Viperidae 2. Cerrado 3. Pleistoceno I.
Universidade de São Paulo. Instituto de
Biociências. Departamento de Genética e Biologia
Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a). Orientador(a)

Dedicatória

À minha família.

Epígrafe

Porque sem uma grande paixão não existe conhecimento.

Rubem Alves

Agradecimentos

Se um ato vale mais que mil palavras, desejo um dia poder retribuir por meio de ações a tudo o que fizeram por mim. Enquanto isso... Tentarei expressar com palavras os meus sinceros agradecimentos...

- Maria José de Jesus Silva, por acreditar em meu potencial, sempre exigir o meu melhor, me proporcionar o melhor ambiente de trabalho que já tive em minha vida, ser tão generosa e correta em todos os momentos, e pela amizade ímpar;

- Vinícius Xavier da Silva, pela co-orientação e dedicação a este projeto; pela disponibilidade em sempre me ouvir e ponderar as decisões importantes deste trabalho, pelo carinho e amizade;

- Pelas amostras de tecidos cedidas, essenciais para o desenvolvimento deste trabalho: Instituto Butantan, Dr. Miguel T. Rodrigues e seus alunos, Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, Coleção Herpetológica da Universidade Nacional de Brasília, Coleção Herpetológica do Instituto de Ciências Exatas e Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, Núcleo de Ofiologia de Porto Alegre da Fundação Parque Zoobotânico do Rio Grande do Sul, Centro de Estudos e Pesquisas Biológicas da Universidade Católica de Goiás, Núcleo de Ofiologia Regional do Mato Grosso da Universidade Federal do Mato Grosso, Serpentário da Universidade Federal da Bahia, Laboratório de Animais Peçonhentos e Toxinas da Universidade Federal de Pernambuco, Serpentário da Universidade de Passo Fundo, Centro de Biologia Genômica e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Museu Nacional de Ciências Naturales (Espanha), Universidade Federal de Alfenas, Universidade Federal de Viçosa, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Museu Nacional, Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos – Universidade Estadual Paulista- Campus Botucatu; UNESP-RC - Universidade Estadual Paulista- Campus Rio Claro; Martin Jansen, Senckenberg, Forschungsinstitute und Naturmuseen.

- Pela leitura de partes deste trabalho: Sofia Marques Silva, José Salvatore Patané, Elkin Suárez, Renata Amaro.

- Lorena Lima, Daniele Silva, Camilla Di Nizo pela ajuda logística para o desenvolvimento da tese.

- Dário Siqueira pela boa vontade, paciência e auxílio com a edição das figuras.

- Instituto Butantan pela infraestrutura.

- Aos companheiros de laboratório Camilla, Lorena, Dani, Karina, Elkin, Leonardo pela cooperação, apoio e momentos de descontração.

- Pesquisadores, funcionários e alunos do LEEV.

- Valdir José Germano por separar os tecidos e exemplares de serpentes.

- Pesquisadores e funcionários do Centro de Biotecnologia, pelo uso do sequenciador.
- Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.
- Todos os funcionários da Secretaria de Pós-graduação e Secretaria do Departamento de Genética, pela boa vontade, prestatividade e toda ajuda com a parte administrativa.
- Dra. Regina Célia Mingroni Netto e Dr. Eduardo Gorab, pelo auxílio da pós-graduação do Departamento de Genética.
- Professores e colegas de pós-graduação pelos conhecimentos e momentos compartilhados.
- CAPES, pela bolsa concedida e apoio financeiro PROEX.
- CNPq, pela bolsa concedida do Programa Ciências sem Fronteiras.
- FAPESP e INCTTOX pelos recursos financeiros para desenvolvimento da pesquisa.
- Nuno Ferrand e Helena Gonçalves por me receberem no CIBIO – Universidade do Porto e fornecerem o suporte para o desenvolvimento dos microsatélites.
- Todos os funcionários e alunos do CIBIO que me acolheram e foram tão carinhosos e gentis; em especial a Susana Lopes, Sofia Mourão, e Patrícia Ribeiro que viabilizaram toda a parte prática do projeto.
- Sofia Marques Silva e sua família, por me receberem de braços abertos na cidade do Porto.
- Maria Magalhães, Tereza Almeida, Patrícia Ribeiro e Patrícia Pereira pelo apoio em todos os momentos, pelos ensinamentos da língua, pela paciência e pelo carinho.
- Ricardo Cordeiro, Bruno Maia, Sofia Marques Silva pela ajuda com alguns programas e análises.
- Todas as funcionárias do alojamento da UP do Campo Alegre, sempre prestativas e carinhosas.
- Todos os companheiros de alojamento, em especial Jacqueline, Fernanda e Camila, por todos os momentos, por todo incentivo.
- Paula Honório e Mario Paz pela ajuda com a ida e chegada a Portugal.
- Aos amigos, o que seria de mim sem os amigos? Fernanda, Lúcio, Marlene, Dirceu, Yukie, Eduardo, Viviane, Renata, Angela Tikkanen, Ronaldo Negrão, Bete, Mislene, Carmô, Rui, Marcos Muniz, Tia Neuza, Jurema, Bia,
- Aos afilhados queridos Sofia, Bento, Gustavo e Ivan.
- À minha família Jeanete, Sônia, Paulo, Ricardo Yaralice, Patrícia, Dário e Ivan pelo apoio incondicional

Índice

Capítulo 1. Introdução Geral	01
Chapter 2. Molecular phylogeny, species delimitation, and biogeography of the <i>Bothrops neuwiedi</i> group (Serpentes, Squamata)	10
Chapter 3. The role of Pleistocene on the current pattern of genetic and spatial structure in East-West Lineage of the <i>Bothrops neuwiedi</i> group from Brazilian Cerrado and southeastern mountaintops	52
Chapter 4. Incipient speciation and the impact of Quaternary climate oscillations in the origin and diversification of populations of the <i>Bothrops neuwiedi</i> group from the Araucaria Forest and Pampa in southern Brazil	87
Chapter 5. Characterization of the hybrid zone among three species of pitvipers from the Brazilian Cerrado: <i>Bothrops marmoratus</i> , <i>B. mattogrossensis</i> , and <i>B. pauloensis</i> (Serpentes, Squamata)	112
Capítulo 6. Discussão Geral e Conclusões	158
Resumo	163
Abstract	165
Apêndices	167

Capítulo 1 - Introdução Geral

Neogeno e Quaternário na diversificação de organismos neotropicais

O debate sobre a diversificação dos organismos neotropicais é antigo e controverso e remete aos estudos de Darwin e Wallace. Estudos filogenéticos, filogeográficos e estimativas de datação a partir de dados moleculares têm contribuído para a melhor compreensão da história evolutiva das espécies, revelando padrões e permitindo a inferência de possíveis mecanismos responsáveis pela diversificação (Rull, 2014).

Eventos tectônicos e reorganizações paleogeográficas do período Neogeno, que compreende as épocas do Mioceno e Plioceno (23,03 – 2,58 Ma), bem como oscilações climáticas do período Quaternário, que englobam o Pleistoceno e o Holoceno (<2,58 Ma), têm contribuído para esta diversificação (Antonelli *et al.*, 2010; Rull, 2011).

Dentre os biomas neotropicais melhor estudados estão as regiões de florestas: Mata Atlântica e Amazônia. Na Mata Atlântica, a região do Rio Doce tem sido evidenciada pela quebra filogeográfica detectada para vários organismos, como lagartos *Gymnodactylus darwinii* (Pellegrino *et al.*, 2005), anfíbios do gênero *Hypsiboas* (Carnaval *et al.*, 2009) e o grupo *Rhinella crucifer* (Thomé *et al.*, 2010), roedores *Blarinomys breviceps* (Ventura *et al.*, 2012), e outros organismos compilados por Martins (2011) e Carnaval *et al.* (2014).

Na região do estado de São Paulo, as quebras filogeográficas não têm correspondência entre os organismos estudados até o momento, como é o caso da serpente *Bothrops jararaca*, cuja barreira é próxima ao Rio Paranapanema (Grazziotin *et al.*, 2006), morcegos *Desmodus rotundus* (Martins *et al.*, 2009), anfíbios do grupo *Phyllomedusa burmeisteri* com quebra próxima ao lineamento de Guapiara (Brunes *et al.*, 2010) e *Proceratophrys boiei*, espécie para a qual a quebra ocorre próxima ao Rio Tietê (Amaro *et al.*, 2012). A Mata Atlântica caracteriza-se pela complexidade de mecanismos responsáveis pelos padrões de

diversificação, entre eles a ocorrência de refúgios (Carnaval *et al.*, 2009), barreiras geográficas (Thomé *et al.*, 2014) e dinâmica climática (Carnaval *et al.*, 2014).

A floresta Amazônica também mostra padrões complexos de diversificação, apresentando grupos com diversificação estimada para a Gondwana, como é o caso das serpentes da família Boidae (Noonan & Chippindale, 2006; Noonan & Sites, 2010) e dos lagartos do gênero *Coleodactylus* (Geurgas *et al.*, 2008). A hipótese dos refúgios do Pleistoceno proposta por Haffer (1969), por exemplo, sugere que a maior parte da diversificação amazônica teria ocorrido durante este período, porém tem sido refutada pelas abordagens com estimativas de datação molecular realizadas em décadas mais recentes.

De acordo com estimativas, os eventos tectônicos e paleogeográficos do Neogeno, como o soerguimento dos Andes, fechamento do istmo do Panamá e incursões marinhas seriam responsáveis pela diversificação da maior parte dos organismos (Antonelli *et al.*, 2010; Rull, 2011). No entanto, as flutuações climáticas do Pleistoceno não devem ser descartadas como responsáveis por parte da biodiversidade atualmente observada (Antonelli *et al.*, 2010; Rull, 2011), não pela sua atuação na formação de refúgios, mas como um fator importante também para outros modelos de especiação (Haffer, 2008; Rull, 2014).

Comparativamente, a diagonal seca de formações abertas - que se estende desde o nordeste do Brasil até o sudeste da Argentina, incluindo a Caatinga, Cerrado, Chaco e Pampa (Vanzolini, 1963; Werneck, 2011; Morrone, 2014) - permanece pouco compreendida. Esta região biogeográfica é denominada domínio Chaquenho (Morrone, 2014).

Alguns trabalhos sugerem que a diversificação de vários organismos nesta região se iniciou no Chaco em direção à Caatinga, como observado para *Drosophila gouveai* (Moraes *et al.* 2009) e *Phyllopezus pollicaris* (Werneck *et al.*, 2012). Outros padrões, diferentemente deste, também foram observados, como é o caso das espécies de plantas restritas ao Cerrado como *Hymenea stagnocarpa* (Ramos *et al.*, 2007) e *Pilosocereus aurisetus*, ambas com diversificação no Pleistoceno (Bonatelli *et al.*, 2014).

Adicionalmente, foram descritas relações entre domínio Chaquenho formado por áreas abertas e domínios vizinhos de áreas florestadas, sendo as áreas abertas consideradas corredores de ligação entre a Mata Atlântica e a Floresta Amazônica (Por, 1992; Costa, 2003; Batalha-Filho *et al.*, 2012; Morrone, 2014).

Neste contexto, estão inseridas as serpentes do grupo *Bothrops neuwiedi*, que possuem ampla distribuição pela diagonal seca de formações abertas e serão abordadas como o material de estudo no presente trabalho (Silva, 2004; Werman, 2005; Silva & Rodrigues, 2008).

Grupo *Bothrops neuwiedi*

A taxonomia atual reconhece oito espécies para o grupo *B. neuwiedi*: *B. erythromelas* (Caatinga), *B. diporus* (Floresta de Araucárias), *B. lutzi* (Cerrado), *B. mattogrossensis* (Cerrado), *B. marmoratus* (Cerrado), *B. neuwiedi* (Cerrado e topos de montanhas do sudeste), *B. pauloensis* (Cerrado), e *B. pubescens* (Pampa) (Werman, 1992, Wüster *et al.*, 2002; Silva, 2004; Castoe & Parkinson, 2006, Silva & Rodrigues, 2008, Fenwick *et al.*, 2009; Carrasco *et al.*, 2011).

A maioria das espécies definidas morfológicamente, com base em padrão de coloração e folidose (contagem de escamas), apresenta sobreposição das distribuições geográficas, mas poucas possuem registros de simpatria (Silva, 2004; Silva & Rodrigues, 2008, Machado *et al.*, 2014). Além disso, algumas espécies apresentam elevada complexidade dos padrões morfológicos, sobreposição de caracteres diagnósticos e ocorrência de intergrados, dificultando a identificação por meio da morfologia (Silva, 2004; Silva & Rodrigues, 2008).

Inferências filogenéticas empregando sequências dos genes mitocondriais *cytb* e *ND4* recuperaram o monofiletismo do grupo *B. neuwiedi* com elevados valores de suporte e, embora não tenha havido concordância com a taxonomia atual, os clados genéticos apresentaram grande concordância geográfica, foram identificadas quatro Linhagens principais altamente estruturadas no território brasileiro: Nordeste I, Nordeste II, Leste-Oeste e Oeste-Sul (Machado *et al.*, 2014).

Dada a amostragem realizada e o arranjo taxonômico vigente, foi recuperado o monofiletismo apenas para a espécie *B. pubescens*. Parte da incongruência

observada foi atribuída à existência de linhagens crípticas, sugerindo-se a existência de três linhagens candidatas a novas espécies: exemplares de *B. neuwiedi* da Serra do Espinhaço, um exemplar de *B. mattogrossensis* (TM173), de Serra da Borda (MT) e um indivíduo de *B. diporus* (PT3404), de Castro Barros, Argentina (Machado *et al.*, 2014).

Outra hipótese sugerida para explicar a ausência de monofiletismo das espécies foi a ocorrência de hibridação, decorrente de evidências de introgressão, principalmente no limite das distribuições geográficas das espécies entre *B. lutzi* e *B. erythromelas* (no limite entre Cerrado e Caatinga) e entre *B. mattogrossensis*, *B. marmoratus* e *B. pauloensis* na região Central do Brasil, no Estado de Goiás.

Outras hipóteses aventadas para explicar o polifiletismo das espécies seriam a ocorrência de retenção de morfologia ancestral, plasticidade fenotípica e convergência morfológica.

Diversificação do Grupo *Bothrops neuwiedi*

As serpentes do grupo *Bothrops neuwiedi* teriam iniciado o processo de diversificação na Caatinga em direção à região sul da América do Sul (Machado *et al.*, 2014), contrariamente ao padrão observado para *Drosophila gouveai* (Moraes *et al.* 2009) e *Phyllopezus pollicaris* (Werneck *et al.*, 2012).

Adicionalmente, as estimativas de divergência para o grupo recuperaram a origem e divergência das quatro principais linhagens durante o Neogeno e diversificação das espécies durante o Quaternário (Machado *et al.*, 2014). Apesar da discordância da ocupação espacial, as estimativas foram coincidentes com a diversificação de outros organismos neotropicais, entre os quais *Cerdocyon thous* (Tchaicka *et al.*, 2006), *Calomys* (Almeida *et al.*, 2007), *Hymenea stignocarpa* (Ramos *et al.*, 2007), *Drosophila gouveai* (Moraes *et al.*, 2009), *Kentropix paulensis* (Werneck *et al.*, 2009), *Rhinella marina* (Maciel *et al.*, 2010), *Phyllopezus pollicaris* (Werneck *et al.*, 2012), *Hypsiboas albopunctatus* (Prado *et al.*, 2012) e *Pilosocereus aurisetus* (Bonatelli *et al.*, 2014).

O grupo *Bothrops neuwiedi*, por sua ampla distribuição, representa um excelente modelo para o estudo da diversificação ao longo da diagonal seca de

formações abertas. Além disso, suscita vários questionamentos acerca da taxonomia, diversidade genética, relações filogenéticas, delimitação de espécies, demografia histórica das populações e biogeografia.

Uma questão crucial é relativa às regiões que ainda necessitam ser amostradas (como os países que fazem fronteira com o território brasileiro, por exemplo) para auxiliar a responder tais questões e compreender melhor a história evolutiva destas serpentes.

Dessa forma, esforços para a compreensão do grupo, entendimento das relações filogenéticas, diversidade genética e sua evolução possibilitarão uma avaliação mais precisa para o desenvolvimento e gerenciamento de projetos que visem à conservação da biodiversidade destes organismos e da diagonal seca de formações abertas.

Em adição às questões relativas à biodiversidade, o grupo *B. neuwiedi* ocorre em áreas muito populosas, tornando-se muito relevante em função dos acidentes ofídicos e do impacto na saúde pública. Pesquisas aplicadas, como a produção de soros antiofídicos e a bioprospecção, também poderão ser beneficiadas pelo conhecimento gerado, ao utilizar uma perspectiva evolutiva para o seu desenvolvimento.

Objetivos

Os objetivos deste trabalho são investigar as relações filogenéticas e filogeográficas dos representantes do grupo *B. neuwiedi*, utilizando marcadores moleculares nucleares e mitocondriais, para fornecer contribuições para a delimitação das espécies, compreensão de possíveis padrões e aventar os mecanismos e processos envolvidos na evolução do grupo.

Para tanto, os objetivos específicos serão abordados, conforme descrição a seguir, na forma de quatro capítulos, correspondentes a quatro manuscritos:

1. Realizar reconstruções filogenéticas - com ampliação da amostragem e marcadores apresentados na literatura - e estimativas de datação para o grupo *Bothrops neuwiedi*. Adicionalmente, realizar análises de delimitação de espécies e biogeográfica para o grupo – Capítulo 1.

2. Realizar uma abordagem filogeográfica inédita para o grupo, empregando múltiplos marcadores nucleares e mitocondriais, objetivando avaliar a influência das flutuações climáticas do Quaternário, bem como das características fisiográficas no grupo *Bothrops neuwiedi*:

2.1. Avaliar a estruturação genética e espacial dos indivíduos que compõem a Linhagem Leste-Oeste – Capítulo 2.

2.2. Avaliar a estruturação genética e espacial de *B. diporus* e *B. pubescens* do sul do Brasil – Capítulo 3.

2.3. Investigar e caracterizar a região de sobreposição e possível zona de hibridação entre as linhagens de *B. pauloensis*, *B. marmoratus* e *B. mattogrossensis*, que ocorrem no Cerrado central brasileiro – Capítulo 4.

Referências bibliográficas

- Almeida FC, Bonvicino CR, Cordeiro-Estrela P (2007) Phylogeny and temporal diversification of *Calomys* (Rodentia, Sigmodontinae): Implications for the biogeography of an endemic genus of the open/dry biomes of South America. *Mol Phylogenet Evol* **42**(2), 449-466.
- Amaro RC, Carnaval AC, Yonenaga-Yassuda Y, Rodrigues MT (2012). Demographic processes in the montane Atlantic Rainforest: molecular and cytogenetic evidence from the endemic frog *Proceratophrys boiei*. *Mol Phylogenet Evol*, **62**, 880-888.
- Antonelli A, Quijada-Mascareñas A, Crawford AJ, Bates JM, Velazco PM, Wüster W (2010) Molecular studies and phylogeography of Amazonian tetrapods and their relation to geological and climatic models. In: *Amazonia, landscape and species evolution: a look into the past*. (eds. Hoorn C, Wesselingh F; Vonhoff H) Blackwell Publishing, Oxford. p. 386-404.
- Batalha-Filho H, Fjeldsa J, Fabre PH, Miyaki CY (2012) Connections between the Atlantic and Amazonian forest avifaunas represent distinct historical events. *J Ornithol*, DOI 10.1007/s10336-012-0866-7
- Bonatelli IA, Perez MF, Peterson AT, Taylor NP, Zappi DC, Machado MC, Moraes EM (2014) Interglacial microrefugia and diversification of a cactus species complex: phylogeography and palaeodistributional reconstructions for *Pilosocereus aurisetus* and allies. *Mol Ecol*, **23**, 3044-3063.
- Brunes TO, Sequeira F, Haddad CFB, Alexandrino J (2010). Gene and species trees of a Neotropical group of treefrogs: Genetic diversification in the Brazilian Atlantic Forest and the origin of a polyploid species. *Mol Phylogenet Evol* **57**-3, 1120-1133.
- Carnaval AC, Hickerson MJ, Haddad CF, Rodrigues MT, Moritz C (2009) Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. *Science*, **323**, 785-789.
- Carnaval AC, Waltari E, Rodrigues MT, Rosauer D, VanDerWal J, Damasceno R, Moritz C (2014) Prediction of phylogeographic endemism in an environmentally complex biome. *Proc R Soc B Biol Sci*, **281**, 20141461.
- Carrasco PA, Mattoni CI, Leynaud GC, Scrocchi GJ (2012) Morphology, phylogeny and taxonomy of South American bothropoid pitvipers (Serpentes, Viperidae). *Zool Scr* **41** (2), 109-124.
- Castoe TA, Parkinson CL (2006) Bayesian mixed models and phylogeny of pitvipers (Viperidae, Serpentes). *Mol Phylogenet Evol* **39**, 91-110.
- Costa LP (2003) The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. *J Biogeogr*, **30**(1), 71-86.
- Fenwick AM, Gutberlet JR RL, Evans JA, Parkinson CL (2009) Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). *Zool J Linn Soc* **156**, 617-640.
- Geurgas SR, Rodrigues MT, Moritz, C (2008). The genus *Coleodactylus* (Sphaerodactylinae, Gekkota) revisited: a molecular phylogenetic perspective. *Mol Phylogenet Evol* **49**, 92-101.
- Grazziotin FG, Monzel M, Echeverrigaray S, Bonatto SL (2006) Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. *Mol Ecol*, **15**(13), 3969-3982.
- Haffer J (1969) Speciation in Amazonian forest birds. *Science*, **165**(3889), 131-137.
- Haffer J (2008) Hypotheses to explain the origin of species in Amazonia. *Brazilian Journal of Biology*, **68**, 917-947.
- Machado T, Silva VX, Silva MJJ (2014) Phylogenetic relationships within *Bothrops neuwiedi* group (Serpentes,

- Squamata): geographically highly-structured lineages, evidence of introgressive hybridization and Neogene/Quaternary diversification. *Mol Phylogenet Evol*, doi: 10.1016/j.ympev.2013.10.003
- Maciel NM, Collevatti RG, Colli GR, Schwartz EF (2010) Late Miocene diversification and phylogenetic relationships of the huge toads in the *Rhinella marina* (Linnaeus, 1758) species group (Anura: Bufonidae). *Mol Phylogenet Evol*, **57**, 787-797.
- Martins FM (2011). Historical biogeography of the Brazilian Atlantic forest and the Carnaval–Moritz model of Pleistocene refugia: what do phylogeographical studies tell us? *Biol J Linn Soc*, **104**(3), 499-509.
- Martins FM, Templeton AR, Pavan AC, Kohlbach BC, Morgante JS (2009) Phylogeography of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*): marked population structure, Neotropical Pleistocene vicariance and incongruence between nuclear and mtDNA markers. *BMC Evol Biol*, **9**(1), 294.
- Moraes EM, Yotoko KS, Manfrin MH, Solferini VN, Sene FM (2009) Phylogeography of the cactophilic species *Drosophila gouveai*: demographic events and divergence timing in dry vegetation enclaves in eastern Brazil. *J Biogeogr*, **36**(11), 2136-2147.
- Morrone JJ (2014) Cladistic biogeography of the Neotropical region: identifying the main events in the diversification of the terrestrial biota. *Cladistics*, **30**(2), 202-214.
- Noonan BP, Chippindale PT (2006) Dispersal and vicariance: the complex evolutionary history of boid snakes. *Mol Phylogenet Evol* **40**, 347–358.
- Noonan BP, Sites Jr JW (2010) Tracing the origins of iguanid lizards and boine snakes of the Pacific. *Am Nat* **175**, 61-72.
- Pellegrino KCM, Rodrigues MT, Waite AN, Morando M, Yassuda YY, Sites Jr JW (2005) Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwini* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. *Biol J Linn Soc* **85**, 13–26.
- Por, FD (1992) Sooretama: the Atlantic rain forest of Brazil. SPB Academic Publishing, The Hague. p. 130.
- Prado CPA, Haddad CFB, Zamudio KR (2012) Cryptic lineages and Pleistocene population expansion in a Brazilian Cerrado frog. *Mol Ecol*, **21**, 921–941.
- Ramos, ACS, Lemos-Filho, JP, Ribeiro, RA, Santos, FR, Lovato, MB (2007) Phylogeography of the tree *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae: Caesalpinioideae) and the influence of Quaternary climate changes in the Brazilian Cerrado. *Ann Bot London*, **100**(6), 1219-1228
- Rull V (2011) Neotropical biodiversity: timing and potential drivers. *Trends Ecol Evol*, **26**, 508-513.
- Rull V (2014) Pleistocene speciation is not refuge speciation. *Journal of Biogeography*, 1-3.
- Silva VX (2004) The *Bothrops neuwiedi* complex. In: *The venomous reptiles of the Western Hemisphere* (Vol. 2) (eds Campbell JA, Lamar WW) Cornell University Press, New York, USA. p 410-422.
- Silva VX, Rodrigues MT (2008) Taxonomic revision of the *Bothrops neuwiedi* complex (Serpentes, Viperidae) with description of a new species. *Phyllomedusa*, **7**, 45-90.
- Tchaicka L, Eizirik E, de Oliveira TG, Cândido JF, Freitas TR (2007) Phylogeography and population history of the crab eating fox (*Cerdocyon thous*). *Mol Ecol* **16**(4), 819-838.
- Thomé MTC, Zamudio KR, Giovanelli JG, Haddad CF, Baldissera FA, Alexandrino J. (2010) Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest. *Mol Phylogenet Evol*, **55**(3), 1018-1031.
- Thomé MTC, Zamudio KR, Haddad CF, Alexandrino J. (2014) Barriers, rather than refugia, underlie the origin of

- diversity in toads endemic to the Brazilian Atlantic Forest. *Mol Ecol*, **23**(24), 6152-6164.
- Vanzolini PE (1963) Problemas faunísticos do Cerrado. *Simpósio sobre o Cerrado*, 307-320.
- Ventura K, Sato-Kuwabara Y, Fagundes V, Geise L, Leite YLR, Costa LP, Rodrigues MT (2012) Phylogeographic structure and karyotypic diversity of the Brazilian shrew mouse (*Blarinomys breviceps*, Sigmodontinae) in the Atlantic Forest. *Cytogenetic and Genome Research*, **138**(1), 19-30.
- Werman SD (1992) Phylogenetic relationships of Central and South American pitvipers of the genus *Bothrops* (*sensu lato*): cladistics analyses of biochemical and anatomical characters. In: *Biology of the pitvipers*. (eds. Campbell JA, Brodie JR ED). Selva Press, Texas, p. 21-40.
- Werman S (2005) Hypotheses on the historical biogeography of bothropoid pitvipers and related genera of the Neotropics. In: *Ecology and Evolution in the Tropics* (eds. Donnelly MA, Crother BI, Guyer C, Wake MH, White ME). University of Chicago Press, Chicago, pp. 306–365.
- Werneck FP (2011) The diversification of eastern South American open vegetation biomes: Historical biogeography and perspectives. *Quaternary Science Review*, **30**, 1630-1648.
- Werneck FP, Gamble T, Colli GR, Rodrigues MT, Sites Jr JW (2012) Deep diversification and long-term persistence in the South American 'dry diagonal': integrating continent-wide phylogeography and distribution modeling of geckos. *Evolution*, **66**, 3014-3034.
- Werneck FP, Giugliano LG, Collevatti RG, Colli GR (2009) Phylogeny, biogeography and evolution of clutch size in South American lizards of the genus *Kentropyx* (Squamata: Teiidae). *Mol Ecol*, **18**, 262-278.
- Wüster W, Salomão MG, Qüijadas-Mascareñas JA, Thorpe RS, BBBSP (2002). Origin and evolution of South America pitviper fauna: evidence from mitochondrial DNA sequence analysis. In: *Biology of the Vipers*. (eds. Schuett GW, Höggren M, Douglas ME, Greene HR). Eagle Mountain Press, Utah, p 111-128.

Conclusões

De acordo com as análises aqui apresentadas, o grupo *B. neuwiedi* possui 14 espécies, reveladas pelos dados moleculares.

A datação molecular corrobora a origem do grupo durante o Mioceno e das cinco principais Linhagens (Nordeste I, Nordeste II, Leste-Oeste, Centro-Oeste e Oeste-Sul) durante o Plioceno, e origem da maioria das espécies e diversificação das populações durante o Pleistoceno.

As análises biogeográficas corroboram a origem do grupo e das espécies associadas primariamente às formações abertas e secas e, além disso, a atual relação do grupo com formações florestais (como a Floresta de Araucárias, Floresta Atlântica do Paraguai e o domínio do Sudoeste Amazônico), possivelmente foi posterior à diversificação das linhagens em áreas abertas.

Todos os resultados obtidos salientam a importância do Quaternário (Pleistoceno e Holoceno) na história evolutiva do grupo *B. neuwiedi*, seja por meio das oscilações climáticas, quanto por eventos tectônicos do período.

O padrão assimétrico de estruturação no DNAmt e microssatélites sustentam a hipótese de fluxo gênico desigual mediado por machos entre as espécies que ocorrem no Cerrado Central: *B. mattogrossensis*, *B. pauloensis*, *B. marmoratus*.

O presente trabalho demonstra como o grupo *B. neuwiedi* pode ser informativo sobre a história evolutiva da diagonal seca de formações abertas, permitindo vislumbrar a complexidade de relações de um grupo de ampla distribuição na região neotropical.

Resumo

O grupo *Bothrops neuwiedi* é composto por serpentes neotropicais que desempenham grande impacto na saúde pública, em decorrência de acidentes ofídicos. O grupo apresenta ampla distribuição ao longo da diagonal seca de formações abertas, desde o nordeste do Brasil até o noroeste da Argentina. A taxonomia atual, baseada principalmente em dados morfológicos qualitativos, não recupera as linhagens evolutivas apontadas pelas abordagens moleculares. O objetivo deste trabalho foi investigar o grupo *B. neuwiedi* utilizando análises filogenéticas, filogeográficas, biogeográficas, estimativa de datação e delimitação de espécies em um total de 276 indivíduos amostrados ao longo de toda a sua distribuição, incluindo representantes do Brasil, Bolívia, Argentina, Paraguai e Uruguai. As análises contemplaram três genes mitocondriais, dois nucleares, dois introns e 33 locos de microssatélites obtidos por sequenciamento de nova geração. Estimou-se, por meio do método de delimitação de espécies e análises filogeográficas, que o grupo *B. neuwiedi* possui ao menos 14 espécies, das quais oito já são reconhecidas (*B. erythromelas*, *B. lutzi*, *B. mattogrossensis*, *B. marmoratus*, *B. neuwiedi*, *B. pauloensis*, *B. pubescens* e *B. diporus*) e seis possíveis espécies (*Bothrops* sp. 1 a *Bothrops* sp. 6). O grupo teria se originado durante o Mioceno e diversificado durante o Plio-Pleistoceno. As flutuações climáticas do Pleistoceno, decorrentes dos ciclos glaciais e interglaciais, desempenharam um importante papel na diversificação das espécies e suas populações. Adicionalmente, eventos tectônicos que ocorreram durante este período também teriam influenciado na estruturação espacial da diversidade genética. Foi revelada uma intrincada relação do domínio biogeográfico Chaquenho (áreas abertas) com os domínios do Sudoeste da Amazônia e do Paraná (áreas de floresta). Nuances na temperatura e aridez, ora permitiram a expansão do Cerrado sobre as florestas, ora possibilitaram a expansão do Chaco sobre o Cerrado, levando à interrupção da conexão entre as populações de manchas de Cerrado nestes domínios florestais. Os resultados evidenciaram a complexidade da diversificação das serpentes na diagonal seca de formações abertas e, dependendo da linhagem, diferentes padrões puderam ser observados.

A Linhagem Leste-Oeste (*B. marmoratus*, *B. neuwiedi*, *Bothrops* sp. 1) apresentou elevado grau de diversidade genética e elevada estruturação espacial, concordante com unidades geomorfológicas do relevo. Nas linhagens do sul do Brasil (*B. pubescens* e *B. diporus*) verificou-se um padrão de diversificação consistente com espécies incipientes em estágios iniciais do processo de especiação. Na região central do Cerrado, propõe-se que as espécies *B. marmoratus*, *B. pauloensis* e *B. matogrossensis* apresentam forte estruturação no DNAm e baixa estruturação nos marcadores nucleares em decorrência de fluxo gênico desigual mediado por machos. Baseado nas informações obtidas neste trabalho, sugerimos fortemente que o grupo *Bothrops neuwiedi* seja revisado sob uma perspectiva multidisciplinar.

Abstract

The *Bothrops neuwiedi* group is composed of Neotropical snakes that have a serious impact on Brazilian public health, as they are responsible for a large number of snakebite accidents. The group is widespread along the dry diagonal of open formations in South America (Chacoan dominion), since northeast Brazil to northwest Argentina. Current taxonomic arrangement is based on blotches and color pattern, which does not represent the evolutionary lineages uncovered in molecular analyses. This study aims to investigate the *B. neuwiedi* group using phylogenetic analyses, biogeography, phylogeography, estimates of divergence, and species delimitation. A total of 276 representatives of the *B. neuwiedi* group were obtained throughout the geographic distribution of the group, including samples from Brazil, Bolivia, Argentina, Paraguay, and Uruguay; in addition, three mitochondrial and two nuclear genes, two introns, and 33 microsatellite loci were used. According species delimitation and phylogeographic approach, 14 species in the *B. neuwiedi* group could be delimited as follows: eight species already recognized (*B. erythromelas*, *B. lutzi*, *B. mattogrossensis*, *B. marmoratus*, *B. neuwiedi*, *B. pubescens*, *B. diporus*, and *B. pauloensis*) and six other putative species (*Bothrops* sp. 1 to *Bothrops* sp. 6). Estimates of divergence placed the origin of the *B. neuwiedi* group in the Miocene and diversification in the Plio-Pleistocene. Climatic fluctuations and tectonic events during the Pleistocene probably played an important role in the species and populations diversification. An intricate network was revealed with Chacoan dominion (open area) and South-west and Paraná dominion (forested areas). Nuances in temperature and aridity, sometimes allowed the expansion of the Cerrado on forests, sometimes allowed the expansion of the Chaco on the Cerrado, leading to the interruption of the connection between the populations of Cerrado patches of forest in these areas. The results showed the complexity of the diversification of snakes in the dry diagonal of open formations and depending on the lineage studied, different patterns were observed. East-West Lineage (*B. marmoratus*, *B. neuwiedi*, *Bothrops* sp. 1) presented high genetic diversity and high genetic and spatial

structure associated with Brazilian geomorphology. *B. pubescens* and *B. diporus* revealed a pattern consistent with incipient species in the early stages of speciation. *B. marmoratus*, *B. pauloensis* and *B. mattogrossensis* presented strong structure in mtDNA and and weak structure in nuclear markers due to male-biased gene flow.