

RENATO SOUSA RECODER

**DIFERENCIAÇÃO MOLECULAR E VARIAÇÃO MORFOLÓGICA EM
LAGARTOS DA TRIBO IPHISINI (SQUAMATA,
GYMNOPHTHALMIDAE)**

*Molecular differentiation and morphological variation in lizards of the tribe
Iphisini (Squamata, Gymnophthalmidae)*



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
Programa de Pós-Graduação em Zoologia

São Paulo
2016

RENATO SOUSA RECODER

**DIFERENCIAÇÃO MOLECULAR E VARIAÇÃO MORFOLÓGICA EM
LAGARTOS DA TRIBO IPHISINI (SQUAMATA,
GYMNOPHTHALMIDAE)**

*Molecular differentiation and morphological variation in lizards of the tribe
Iphisini (Squamata, Gymnophthalmidae)*

Tese apresentada ao Instituto
de Biociências da
Universidade de São Paulo
para obtenção do título de
Doutor em Ciências na área de
Zoologia.

Orientador: Prof. Dr. Miguel
Trefaut Urbano Rodrigues

São Paulo
2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

RECODER, Renato Sousa

Diferenciação molecular e variação morfológica em lagartos da tribo Iphisini (Squamata, Gymnophthalmidae); São Paulo, 2016.

77p.

Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016. Departamento de Zoologia.

1. Especiação. 2. Filogeografia. 3. Microteídeos. 4. Macroevolução. 5. Sistemática Molecular. I. Rodrigues, Miguel Trefaut. II. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Zoologia.

Nome: RECODER, Renato Sousa

Título: Diferenciação molecular e variação morfológica em lagartos da tribo Iphisini (Squamata, Gymnophthalmidae).

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências na área de Zoologia.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____ .
Julgamento: _____ Assinatura: _____ .

Prof. Dr. _____ Instituição: _____ .
Julgamento: _____ Assinatura: _____ .

Prof. Dr. _____ Instituição: _____ .
Julgamento: _____ Assinatura: _____ .

Prof. Dr. _____ Instituição: _____ .
Julgamento: _____ Assinatura: _____ .

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos curadores das coleções científicas e colegas que forneceram o material genético e exemplares para esta tese: Hussan Zaher (Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo); Adrian Garda (Universidade Federal do Rio Grande do Norte); William Vaz (PUC de Goiás); Hugo Bonfim, Sônia Santesso e Juliana Rodrigues (RAN – ICMBio); Felipe Curcio (Universidade Federal do Mato Grosso); Camila Ribas, Vinícius Carvalho e Fernanda Werneck (INPA Manaus); Selma Torquato (Universidade Federal de Alagoas); Paulo Passos (Museu Nacional do Rio de Janeiro); Frederick Sheldon e Donna Dittmann (Louisiana State University); Dyego Costa e Márcio Chaves (Universidade Federal de Campina Grande); Antônio Argôlo (Universidade Estadual de Santa Cruz). Agradeço aos amigos e colegas que estiveram em campo atrás de calangos ou fizeram companhia no dia-a-dia de laboratório neste período: Paula Valdujo, Mauro Teixeira Jr., Francisco Dal Vechio, José Cassimiro, Carolina Nisa, Marco Sena, Sergio Bogão, Juliana Roscito, Antoine Fouquet, Roberta Damasceno, Agustín Camacho, Pedro Nunes, José Mario Ghellere, Ivan Prates, Maria Strangas, Danielle Rivera, Ana Carolina Carnaval, Renata Cecília Amaro, Marcia Laguna, Federico Arias, Hugo Bonfim, Juliana Rodrigues, Maurivan Ribeiro, Geraldo Tracajá, Sabrina Baroni, Maíra Concistré (*im memoriam*), Bruna Batista. Agradeço à minha família pelo apoio incondicional, interesse, e paciência ao longo da produção desta tese. Agradeço ao Miguel Trefaut pela orientação, pelo interesse e apoio, por todo o suporte logístico sem os quais seria impossível obter os resultados desta tese. Por fim agradeço aos funcionários e membros da comissão de pós pelo apoio logístico e à FAPESP pelo financiamento na forma de bolsa de doutorado (processo 2012/09463-0).

RESUMO

Recoder, R. S. **Diferenciação molecular e variação morfológica em lagartos da tribo Iphisini (Squamata, Gymnophthalmidae)**. 2016. 77p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A delimitação de espécies é essencial para a caracterização e conservação da biodiversidade. No entanto, representa um desafio para grupos onde há pouca variação em morfologia, como no caso dos lagartos Iphisini. São conhecidas oito espécies pertencentes a seis gêneros na tribo, com base em análises moleculares e de anatomia hemipeniana foram detectadas quatro espécies candidatas para *Iphisa*. A tribo filogeneticamente aparentada Gymnophthalmini apresenta maior riqueza de espécies e diversidade morfológica, principalmente em espécies com adaptações para a vida fossorial. No entanto, ainda se conhece pouco sobre os mecanismos históricos e ecológicos que causam distintos padrões de especiação, apesar de historicamente o papel de isolamento geográfico ter sido enfatizado para a biota Neotropical. Em tempos recentes, foram desenvolvidos métodos quantitativos para abordar questões evolutivas como probabilidades de especiação, variações em taxas de diversificação e reconstrução de demografia histórica de populações e migração. Implementei neste estudo uma combinação de métodos quantitativos com uso de dados moleculares, morfológicos e ambientais para testar as hipóteses que: há diversidade não reconhecida em Iphisini; as diferenças em riqueza e disparidade morfológica entre Iphisini e outras tribos de Gymnophthalminae se deve a diferenças em tempo e modo de diversificação, e que a diversificação em *Acratosaura* ocorreu por isolamento geográfico causado por flutuações paleoclimáticas. Com base em análises moleculares, foram delimitadas quatro espécies candidatas para Iphisini, aumentando em 33% a diversidade conhecida para a tribo. Não houve variação entre as espécies candidatas de *Acratosaura* em morfometria. A filogenia estimada para Gymnophthalminae apresentou alto suporte para a relação entre Iphisini e Heterodactylini, e demonstra um tempo de diversificação e riqueza neste clado similar a Gymnophthalmini. As tribos apresentaram padrões de diversificação semelhantes, mas taxas distintas. Os padrões de evolução morfológica foram congruentes com a diversificação em Gymnophthalmini, porém distintas em Heterodactylini *sensu lato*, indicando que

disparidade independe de diversificação. As análises filogeográficas indicam que as populações de *Acratosaura* apresentaram estabilidade demográfica e espacial ao longo do tempo, com evidências de fluxo gênico entre linhagens diferenciadas. Desta forma, os resultados sugerem que *Acratosaura* diversificou sem influência de variações históricas no clima, e provavelmente sem isolamento reprodutivo completo.

Palavras-chave: Especiação, Filogeografia, Microteídeos, Macroevolução, Sistemática Molecular.

ABSTRACT

Recoder, R. S. **Molecular differentiation and morphological variation in lizards of the tribe Iphisini (Squamata, Gymnophthalmidae)**. 2016. 77p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo. Species delimitation is essential for characterization and conservation of biodiversity. Nevertheless, it represents a challenge for groups in which morphological variation is subtle, such as the microteiid lizards of the tribe Iphisini. Eight species from six genera are currently recognized in the tribe but recently, based on molecular analysis and hemipenial anatomy, four candidate species were inferred for *Iphisa*. The phylogenetically related tribe Gymnophthalmini presents higher species richness and morphological diversity, specially in forms with adaptations to fossoriality. Nevertheless, the historical and ecological mechanisms involved in the distinct speciation patterns are poorly known, although geographical isolation have been historically emphasized for neotropical biota. In recent times, quantitative methods were developed to address evolutionary questions such as speciation probabilities, variation in diversification rates and reconstruction of historical demography of populations and migration. In this study I used a combination of quantitative methods based on molecular, morphological and environmental data for testing the hypothesis that: there is unrecognized diversity within Iphisini; differences in species richness and disparity among Iphisini and related tribes are congruent with differences in time and mode of diversification; and that diversification in *Acratosaura* occurred with geographical isolation caused by paleoclimatic

fluctuations. Based on the results of molecular analyses, four candidate species were delimited for Iphisini, rising in 33% the tribe diversity. There was no significant variation in morphometry between candidate species of *Acratosaura*. The phylogeny of Gymnophthalminae presented high support for the relationship between Iphisini and Heterodactylini, and showed diversification timing and species richness comparable between this clade and Gymnophthalmini. The tribes presented similar diversification patterns but distinct rates. The patterns of morphological evolution were congruent with diversification patterns in Gymnophthalmini but distinct in Heterodactylini *sensu lato*, indicating that disparity is independent from diversification in the group. The phylogeographic analyses indicate that populations of *Acratosaura* presented demographic and spatial stability through time, with evidences of gene flow among lineages after differentiation. Thus, the results suggest that diversification of *Acratosaura* was not influenced by variations in historical climate, and probably occurred without complete reproductive isolation.

Keywords: Phylogeography, Microteiids, Macroevolution, Molecular Systematics, Speciation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	09
2. DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES EM LAGARTOS DA TRIBO IPHISINI (SQUAMATA, GYMNOPHTHALMIDAE) COM BASE EM CARACTERES MOLECULARES E MORFOLÓGICOS	13
3. PADRÕES FILOGENÉTICOS DE DIVERSIFICAÇÃO E DISPARIDADE MORFOLÓGICA EM LAGARTOS DA SUBFAMÍLIA GYMNOPHTHALMINAE	35
4. ESTRUTURA FILOGEOGRÁFICA E DEMOGRAFIA HISTÓRICA EM LAGARTOS DO GÊNERO <i>ACRATOSAURA</i>	50
5. CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS	67
APÊNDICES	78

1. INTRODUÇÃO

A região Neotropical destaca-se mundialmente em termos de biodiversidade (Mittermeier et al., 1997). É estimado que Brasil abrigue mais de 10% da diversidade mundial, sendo considerado um país megadiverso (Mittermeier et al., 1997; Lewinsohn & Prado, 2005). Em relação aos répteis, apresenta a terceira maior riqueza de espécies (796 spp.) sendo superada apenas por Austrália e México (Uetz et al., 2016). No entanto, os desafios de se delimitar e documentar a diversidade são enormes, e o conhecimento do número de espécies de répteis brasileiros é ainda limitado. Uma grande quantidade de espécies é descrita por ano, sobretudo do grupo dos “escamados” (Squamata), ou seja, lagartos, anfisbenas e serpentes. A espécie representa a unidade comparativa básica em diversos campos das Ciências Biológicas, portanto identificar e descrever espécies tem um papel fundamental para o estudo e conservação da biodiversidade (Agapow et al., 2004). Soma-se à urgência de se reconhecer adequadamente as espécies em um cenário de perda de habitat extensiva e crise de extinções (Myers et al., 2000).

Os desafios são maiores em grupos em que há pouca variação fenotípica, o que tem sido chamado de complexo de “espécies crípticas” (Bickford et al., 2007). Este é o caso da tribo Iphisini, um clado de lagartos microteídeos (Gymnophthalmidae) cujos membros apresentam forma de corpo conservada (Rodrigues et al., 2007). São formalmente reconhecidas oito espécies na tribo: *Acratosaura mentalis* (Amaral, 1932); *Acratosaura spinosa* Rodrigues, Cassimiro, Freitas e Silva, 2009; *Alexandresaurus camacan* Rodrigues, Pellegrino, Dixo, Verdade, Pavan e Sites, 2007; *Colobosaura modesta* (Reinhardt e Lütken, 1862); *Iphisa elegans* Gray, 1851 (contendo a subespécie *Iphisa elegans soinii* Dixon, 1974); *Rondonops biscutatus* Colli, Hoogmoed, Cannatella, Cassimiro, Gomes, Ghellere, Nunes, Pellegrino, Salerno, Souza, e Rodrigues, 2015; *Rondonops xanthomystax* Colli, Hoogmoed, Cannatella, Cassimiro, Gomes, Ghellere, Nunes, Pellegrino, Salerno, Souza, e Rodrigues, 2015 e *Stenolepis ridleyi* Boulenger, 1887. Estas são espécies de pequeno porte (até 70 mm de comprimento rostro-cloacal), com corpo alongado, membros reduzidos e cauda longa com duas a três vezes o comprimento do corpo (Fig.1.1). As espécies possuem hábitos semi-fossoriais sendo encontradas entre

folhas, galhos ou sob pedras no solo em diferentes tipos de habitats como florestas úmidas, cerrados, campos rupestres, caatingas arbóreas e matas secas. A tribo está amplamente distribuída na América do Sul cisandina ocorrendo nas regiões da Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica e Caatinga (Fig.1.2). As espécies de Iphisini apresentam também pouca variação em caracteres merísticos e coloração, e até recentemente eram considerados raros em coleções científicas (Rodrigues et al., 2007), características que favoreceram com que a sistemática do grupo estivesse por longo tempo sem avanços. Porém, nos últimos dez anos, a descoberta e descrição de novas espécies e reavaliações das relações filogenéticas ampliaram o conhecimento sobre a diversidade do grupo (Rodrigues et al., 2007; Rodrigues et al., 2009a,c; Colli et al., 2015).

Nunes (2011), ao estudar a morfologia hemipeniana de espécies de Gymnophthalmidae, observou uma variação populacional destacada em *Iphisa elegans* que, apesar de ser amplamente distribuída na bacia amazônica, possui morfologia externa extremamente conservada. Foram descritos cinco morfótipos distintos de hemipênis para *Iphisa*, que se mostraram congruentes com uma estrutura molecular profunda, sugerindo a presença de ao menos quatro espécies candidatas no gênero (Nunes et al., 2012). Os resultados também sustentam o status de espécie para *Iphisa elegans soinii* Dixon, 1974. Desta forma, é possível esperar que a diversidade em Iphisini seja subestimada e que outros gêneros possam apresentar espécies candidatas.

A tribo Iphisini, juntamente com Heterodactylini e Gymnophthalmini compõe a subfamília Gymnophthalminae (Pellegrino et al., 2001; Goicoechea et al., 2016). Heterodactylini (*sensu* Rodrigues et al. 2009c) representa um grupo pouco diverso, com três gêneros e seis espécies, distribuído ao longo da Mata Atlântica e contato com biomas abertos, com padrão de corpo similar aos representantes de Iphisini e pouca variação em morfologia (à exceção de *Heterodactylus*) (Rodrigues et al., 2009b). Análises moleculares recentes suportam a relação entre Iphisini e Heterodactylini formando um clado monofilético (Heterodactylini *sensu* Pellegrino et al., 2001) composto, portanto, por 14 espécies descritas (Goicoechea et al., 2016). Gymnophthalmini é representada por 26 espécies com grande diversidade de formas de corpo, padrões de coloração, e caracterizada por apresentar exemplos de adaptações

morfológicas extremas à vida fossorial, com perda de pálpebras móveis, redução ou perda de membros locomotores, fusão de escamas cefálicas e ausência de ouvido externo (Rodrigues 1991, Rodrigues e Santos, 2008).

Os padrões de evolução de corpos serpentiformes têm sido estudados comparativamente em Gymnophthalminae sob um ponto de vista ecológico e anatômico (Grizante et al., 2012; Roscito e Rodrigues, 2012; Camacho et al., 2014). No entanto, pouco se conhece sobre padrões históricos de diversificação no grupo, para se avaliar se a disparidade morfológica entre as tribos pode ser explicada por diferentes taxas de especiação (Harmon et al., 2003). Também se conhece pouco sobre mecanismos envolvidos na diferenciação em nível populacional em Gymnophthalminae. Os estudos publicados utilizando uma abordagem molecular intra-específica têm demonstrado o papel de vicariância (Siedchlag et al., 2010), da topografia (Santos et al., 2014) ou sugerido mecanismos de isolamento pré-zigótico (Nunes et al., 2012) para a diferenciação de espécies. Apesar de hipóteses de especiação terem sido formalmente testadas (Santos et al., 2014), ainda faltam abordagens com base em modelos de genética de populações para caracterizar o papel de fluxo gênico na diferenciação das espécies de Gymnophthalminae.

OBJETIVOS

Neste estudo, implementei uma abordagem analítica quantitativa com base em dados morfológicos, moleculares e ambientais com o objetivo de:

1. Testar a hipótese de que há diversidade não revelada em outros gêneros da tribo Iphisini, assim como demonstrado para *Iphisa*.
2. Testar a hipótese de que não há relação entre taxa de diversificação e disparidade morfológica para as tribos de Gymnophthalminae.
3. Testar a hipótese de que as espécies de *Acratosaura* diferenciaram-se por isolamento geográfico, causado por flutuações paleoclimáticas.

FIGURAS

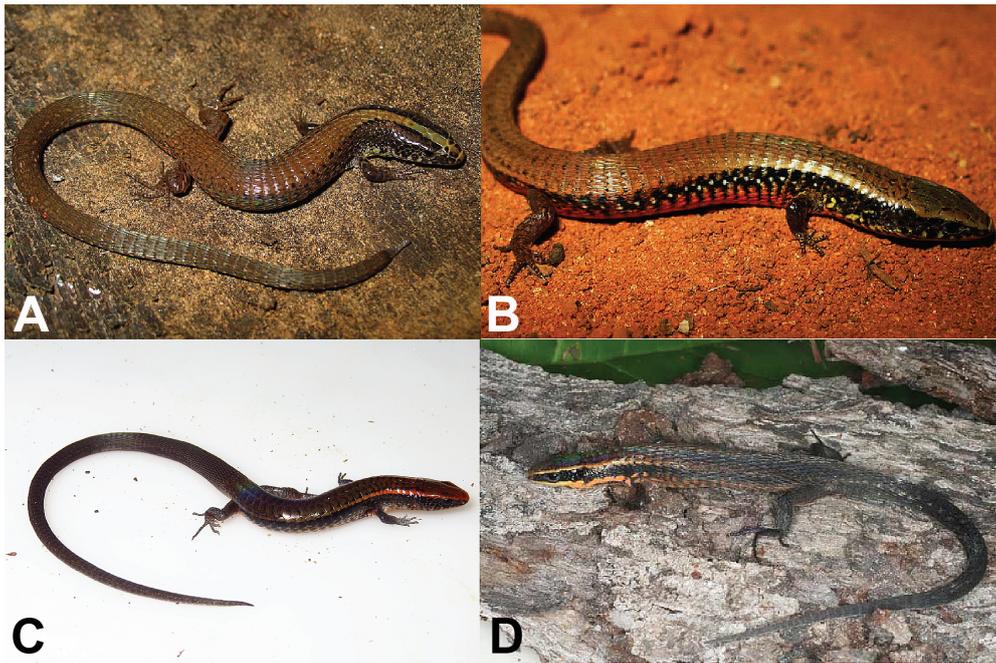


Figura 1.1. Exemplos de espécies de Iphisini: A) *Acratosaura mentalis*; B) *Colobosaura modesta*; C) *Iphisia elegans*; D) *Rondonops xanthomystax*.

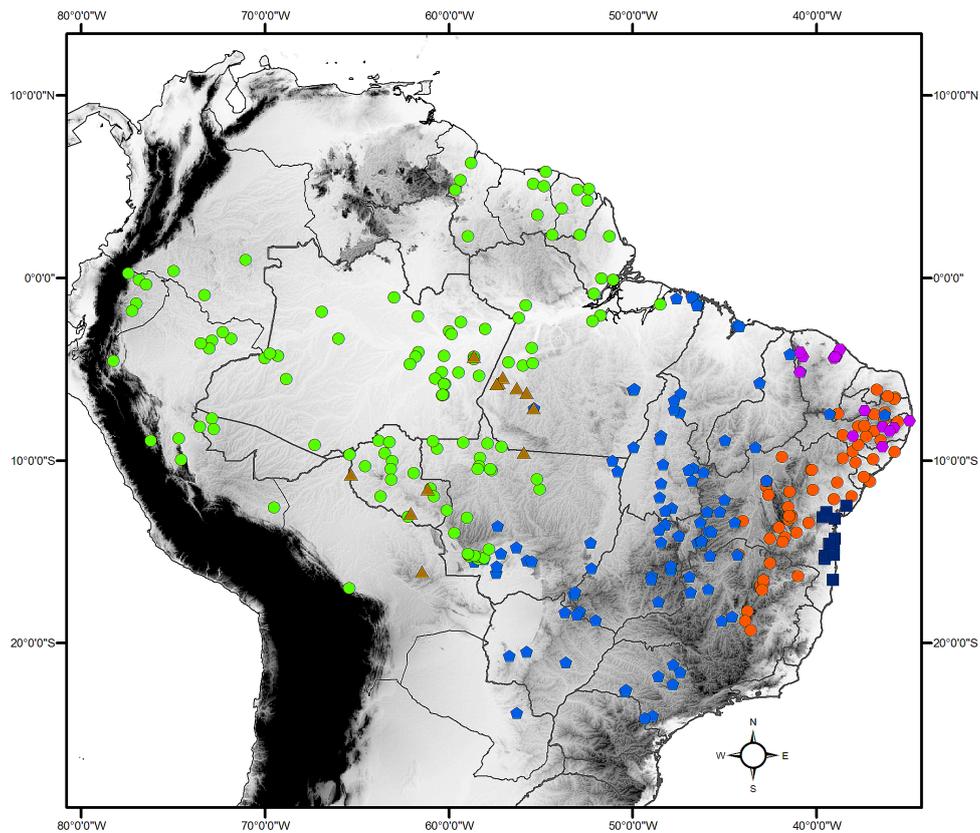


Figura 1.2. Distribuição dos seis gêneros de Iphisini: *Alexandresaurus* (quadrados azuis), *Acratosaura* (círculos vermelhos), *Colobosaura* (pentágonos azuis), *Iphisia* (círculos verdes), *Rondonops* (triângulos marrons) e *Stenolepis* (hexágonos roxos).

2. DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES EM LAGARTOS DA TRIBO IPHISINI (SQUAMATA, GYMNOPHTHALMIDAE) COM BASE EM CARACTERES MOLECULARES E MORFOLÓGICOS.

INTRODUÇÃO

A taxonomia experimentou enormes avanços metodológicos em tempos recentes, a partir do momento em que a obtenção de marcadores genéticos de organismos não modelos se tornou uma prática acessível (Sites e Marshall, 2003). Nos últimos anos, foi desenvolvida uma série de métodos quantitativos para delimitação espécies com uso de dados moleculares (Wiens, 2007; Carstens et al., 2013; Rannala, 2015), que abriram a possibilidade de se trabalhar com múltiplas linhas de evidências e, portanto, a implementação de abordagens integradas para a tomada de decisões taxonômicas (Dayrat, 2005; Padial et al., 2010). Os métodos moleculares se mostraram especialmente úteis para avaliar grupos onde a variação em caracteres morfológicos é baixa, dificultando a delimitação visual de potenciais espécies (Fujita et al., 2012; Barley et al., 2013).

A abordagem “multi-espécies coalescente” foi fundamental para aproximar o campo da sistemática molecular da genética de populações, por acomodar a discordância entre genealogias estimadas para *loci* individuais com a árvore-de-espécies resultante (Knowles e Carstens, 2007). Assim, são levados em consideração presença de fluxo-gênico e/ou segregação incompleta de linhagens, processos comuns em populações recém diferenciadas (Degnan e Rosenberg, 2009). Desta forma, foram propostos métodos probabilísticos coalescentes capazes de avaliar inúmeras hipóteses de delimitação de espécies com modelos estimados com parâmetros genéticos populacionais (Knowles e Carstens, 2007; Yang e Rannala, 2010, Fujita et al., 2012). Novos métodos empíricos e implementações continuam sendo propostos, mostrando que a delimitação quantitativa de espécies é um campo de estudo em pleno desenvolvimento (Fujita et al., 2012; Fujisawa e Barraclough, 2013; Edwards & Knowles, 2014; Grummer et al., 2014; Yang e Rannala, 2014). No entanto, apesar de análises moleculares terem se tornado ferramentas essenciais para a

taxonomia em tempos recentes (Fujita et al. 2012), há um consenso na necessidade de haver complementação por outros tipos de dados, sobretudo fenotípicos, para a exploração mais abrangente dos fatores envolvidos com especiação e portanto, uma delimitação mais robusta de espécies (Bauer et al., 2011; Solís-Lemus et al., 2015; Zamudio et al., 2016).

Um grupo que apresenta desafios para a delimitação de espécies é Gymnophthalmidae, uma família diversa (c.a., 240 spp.) cujos membros são informalmente conhecidos como lagartos microteídeos, com distribuição Neotropical, e caracterizados pela presença de morfótipos variáveis (Pellegrino et al., 2001; Wiens et al., 2006). Alguns clados, como é o caso da tribo Iphisini, apresentam morfologia externa conservada, o que tem dificultado a sistemática do grupo (Rodrigues et al., 2007, 2009). No entanto, análises moleculares e estudos de anatomia interna, demonstraram que há diversidade subestimada na tribo (Nunes et al., 2012).

Como diferenças intra-genéricas em morfologia externa são sutis (Rodrigues et al., 2007; Nunes et al., 2012), neste capítulo, foram utilizados diferentes métodos quantitativos para delimitação de espécies com uso de dados moleculares e morfológicos, com o objetivo de testar a presença de espécies não reconhecidas em Iphisini. A abordagem se baseou em quatro etapas: o levantamento de uma hipótese inicial de espécies candidatas com método aplicado a uma genealogia mitocondrial, a visualização de discordância entre filogenias mitocondrial e nuclear com teste de hibridação, e validação das espécies candidatas com métodos baseados em coalescência e morfometria. Com base nos resultados, são discutidas as implicações para a diversidade e taxonomia do grupo.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem molecular e sequenciamento

Para as análises moleculares foram utilizadas amostras de tecido das espécies-alvo preservadas em etanol 95%, retiradas de fígado ou músculo. Foi extraído o DNA de um total de 35 amostras de *Acratosaura mentalis* de 24 localidades, três de *A. spinosa* (incluindo a série tipo), 12 de *Alexandresaurus camacan* de sete localidades, 51 de *Colobosaura modesta* de 43 localidades, 30

de *Iphisa elegans* (incluindo as duas subespécies *I. e. elegans* e *I. e. soinii*) de 28 localidades, 11 de *Stenolepis ridleyi* de seis localidades, duas de *Rondonops biscutatus* e cinco de *Rondonops xanthomystax*. Desta forma, foi possível obter representatividade para todas as espécies atualmente reconhecidas na tribo Iphisini, e cobrir boa parte da distribuição conhecida de cada gênero. Como grupos-externos, foram utilizadas amostras de espécies representantes das tribos Heterodactylini (*Caparaonia itaquara* Rodrigues et al., 2009c; *Colobodactylus dalcyanus* Vanzolini e Ramos, 1977; *Heterodactylus imbricatus* Spix, 1825), Gymnophthalmi (*Micrablepharus maximiliani* Reinhardt & Lütken, 1862; *Psilophthalmus paeminus* Rodrigues, 1991b) e Cercosaurini (*Cercosaura ocellata* Wagler, 1830). Amostras foram obtidas em coletas de campo ou cedidas das coleções de tecidos do Departamento de Zoologia da Universidade de São Paulo, Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, Coleção Herpetológica da Universidade Federal do Mato Grosso (Apêndice 1).

As alíquotas de tecido previamente preservadas em etanol foram maceradas em 300 μ L de solução de lise celular. Em seguida foram adicionados 3 μ L de enzima proteinase K (20mg/ μ L), e incubadas em estufa por cerca de dez horas a 55°C. A extração de DNA celular foi feita com base em Acetato de Amônia, seguindo protocolo básico descrito em Fetzner (1999). Após a extração, o DNA foi ressuspensionado em 100 μ L de solução tampão (TLE), a concentração de DNA estimada por espectrofotômetro da marca NANODROP®, e diluído para se obter amostras com 20 ng/ μ L de DNA.

Foram selecionados, com base na literatura, *primers* para sete marcadores moleculares (Tabela 2.1): gene mitocondrial 16S RNA Ribossomal (16S), gene mitocondrial NADH Desidrogenase Subunidade 4 (ND4), os *exons* nucleares Fator Promotor de Maturação de Oócitos (C-mos), Gene Ativador de Recombinação 1 (Rag-1), Gene Receptor de Prolactina (PRLR), Cadeia Pesada 3 da Dineína Axonemal (DNAH3) e Neurotrofina-3 (NTF3).

A amplificação dos fragmentos selecionados foi feita em solução com volume final de 15 μ L contendo 5,95 μ L de H₂O milli-Q, 1,5 μ L de *buffer* de reação 10x, 0,15 μ L de *Taq* Polimerase (0,01 u/ μ L), 0,9 μ L do cofator da reação MgCl₂ (1,5 mM), 1,5 μ L total de solução de bases nitrogenadas dNTPs (0,2 mM cada), 1,5 μ L de cada *primer* específico *forward* (F) e *reverse* (R) descritos na Tabela 2.1, e 2 μ L de solução diluída de DNA. As condições de reação em termociclador

seguiram um ciclo básico de PCR com desnaturação inicial a 94°C por 3 min, seguido de 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 30 seg, anelamento entre 51-53°C (Tabela 2.1) por 30 seg, e extensão a 72°C por 40 seg, seguido de um ciclo final a 72°C por 7 min, e terminando a reação a 4°C. Algumas variações no ciclo básico foram eventualmente realizadas, sendo válido de menção o aumento do período de extensão no caso de fragmentos mais longos (> 600 pb).

Os produtos de PCR foram purificados com Exonuclease I (EXO) e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) e visualizados em gel de agarose a 2% para quantificação. O sequenciamento de ambas as fitas (F e R) dos fragmentos obtidos foram realizados através de ABI BIG DYE V3.1 (ABI, Foster City, USA) e resolvidos em um sequenciador automático do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB-USP) ou do Instituto de Química (IQ-USP) da Universidade de São Paulo. As sequências foram editadas e alinhadas com o programa GENEIOUS 6.1 (Kearse et al., 2012).

Tabela 2.1. Marcadores moleculares selecionados. São apresentadas informações sobre o tipo de marcador, os *primers* utilizados, a temperatura de anelamento e as respectivas referências.

Gene	Tipo	Primers	T°C	Referência
ND4 - NADH desidrogenase subunidade 4	mtDNA (codificante)	ND4F: CACCTATGACTACCAAAAAGCTCATGTAGAAG ND4R (LEU): CATTACTTTTACTTGGATTTGCACCA	52	Arévalo et al., 1994
16S - RNA ribossomal 16S	mtDNA (ribossomal)	16SF: 5' CTGTTTACCAAAAACATMRCCTYTAGC 3' 16SR: 5' TAGATAGAAACCGACCTGGATT 3'	51	Pellegrino et al., 2001
CMOS - Fator promotor de maturação de oócitos	nuDNA (Exon)	G73: GCGGTAAAGCAGGTGAAGAAA G74: TGAGCATCCAAAGTCTCCAATC	53	Saint et al., 1998
RAG1 - Gene ativador de recombinação 1	nuDNA (Exon)	RAG1_F1a: CAGCTGYAGCCARTACCATAAAAT RAG1_R2: CTTTCTAGCAAAATTTCCATTCAT	51	Wiens et al., 2008
PRLR - Gene receptor de prolactina	nuDNA (Exon)	PRLR_F1: GACARYGARGACCAGCAACTRATGCC PRLR_R3: GACYTTGTGRACCTCYACRTAATCCAT	51	Townsend et al., 2008
DNAH3 - Cadeia pesada 3 da dineína axonemal	nuDNA (Exon)	DNAH3_F1: GGTA AAAATGATAGAAGAYTACTG DNAH3_R6: CTKGAGTTRGAHACAATKATGCCAT	53	Townsend et al., 2008
NTF3 - Neurotrofina 3	nuDNA (Exon)	NTF3_F1: ATGTCCATCTTGTTTTATGTGATATTT NTF3_R1: ACRA GTTTTRTTGTTTCTGAAGTC	53	Townsend et al., 2008

Alinhamentos preliminares foram feitos com CLUSTALW 2.1 (Larkin et al., 2007), com parâmetros padrões. Os genes codificadores de proteína foram

traduzidos em aminoácidos para servir como guia para os alinhamentos, e as sequencias de DNA originais utilizadas nas análises. O programa GBLOCKS 0.91b (Castresana, 2000) foi utilizado para eliminar sítios mal alinhados ou cuja homologia é ambígua, permitindo posições com até 50% de sequencias com *gaps* e parâmetro rigoroso de seleção de blocos, resultando na exclusão de 41 pb (três blocos) do marcador mitocondrial 16S e 13pb de ND4. As heterozigoses dos marcadores nucleares foram resolvidas com PHASE 2.1 (Stephens et al., 2001) para cada alinhamento individual, implementado em DNASP 5.1 (Librado & Rozas, 2009) utilizando 1.000 iterações, um intervalo de amostragem (“*thinning*”) unitário e *burn-in* de 100 iterações. Foi utilizado um limite de probabilidade posterior de 0,9 nas chamadas de bases para determinar a reconstrução mais provável de haplótipos para cada indivíduo (Tabela 2.2). A presença de recombinação foi testada pelo método de “diferença na soma de quadrados” (*Dss statistics*, McGuire e Wright, 2000) em TOPALI 2.5 (Milne et al., 2009). Como não houve suporte para presença de recombinação nos *loci* selecionados, o conjunto de dados completo foi retido para as análises.

Tabela 2.2. Comprimento do alinhamento (pb), amostragem de indivíduos (N), índices de diversidade genética, e melhor modelo de evolução nucleotídica estimado para cada *locus* utilizado. Os índices foram calculados apenas utilizando indivíduos de Iphisini e se referem a número de sítios polimórficos (P), número de haplótipos únicos (*h*), diversidade haplotípica (*Hd*), diversidade nucleotídica (π) e número médio de diferenças nucleotídicas entre pares de sequencias (*k*).

<i>locus</i>	pb	N	P	<i>h</i>	<i>Hd</i>	π	<i>k</i>	modelo
16S	492	130	98	76	0,986	0,042	19,25	GTR+I+G
ND4	739	130	352	114	0,997	0,154	104,10	GTR+I+G*
<i>Cmos</i>	396	51	26	23	0,906	0,011	4,50	HKY+I
<i>DNAH3</i>	714	47	74	34	0,953	0,022	15,71	HKY+G
<i>NTF3</i>	600	55	32	21	0,916	0,016	9,69	HKY+G
<i>PRLR</i>	542	52	76	35	0,956	0,029	14,81	HKY+G
<i>Rag-1</i>	986	40	67	29	0,916	0,013	13,31	HKY+G

Inferências filogenéticas

Um alinhamento concatenado dos marcadores mitocondriais 16S e ND4 (total de 1230 pb) foi gerado com SEQUENCEMATRIX 1.7 (Vaidya et al., 2011) e uma árvore filogenética bayesiana ultramétrica inferida com o programa BEAST 1.8 (Drummond et al., 2012). Foi selecionado um indivíduo por localidade amostrada e sequencias idênticas foram removidas, com o objetivo de evitar

ramos com comprimento zero, resultando num conjunto de dados final composto por 115 terminais incluindo grupos externos. O melhor modelo de substituição nucleotídica para cada *locus*, selecionado em PARTITIONFINDER (Lanfear et al., 2012) utilizando o critério de Akaike (Burnham & Anderson, 2002), foi GTR+I+G para 16S e a terceira posição do códon do gene ND4, HKY+I+G para a primeira posição e TIM+I+G para a segunda posição de códon de ND4, respectivamente. A presença de um relógio molecular global foi rejeitada em um teste de razões de verossimilhança (*likelihood ratio test*). Foi utilizado então um modelo de relógio molecular relaxado (*uncorrelated lognormal relaxed clock*, UCLN) com taxa de mutação fixada em 0,01 e um modelo de especiação de taxa constante (*Yule process*). A análise foi corrida por $2,0 * 10^7$ gerações, com amostragens feitas a cada 1.000 gerações. A convergência dos parâmetros, estacionaridade e tamanhos de amostra efetivo altos ($ESS > 200$) foram inspecionados em TRACER 1.6 (Rambaut et al., 2014). Uma árvore consenso foi gerada pelo critério de *maximum clade credibility* (MCC) após o descarte de quatro mil árvores (20%) pelo *burn-in*, com TREEANNOTATOR 1.8 (Drummond et al., 2012).

Foi estimada uma filogenia bayesiana a partir do alinhamento dos cinco marcadores nucleares concatenados (3236 pb) para 62 exemplares incluindo as espécies candidatas inferidas (ver adiante), com o programa MRBAYES 3.2 (Ronquist et al., 2012). Em caso de sequências com heterozigotes, um dos alelos estimados por PHASE foi arbitrariamente escolhido para ser incorporado na matriz. Foram utilizadas três partições com modelos de substituição de nucleotídeos determinados por JMODELTEST 2.1.6 (Tabela 2.2). A análise foi comparada com a genealogia de mtDNA, para se observar possíveis discrepâncias entre as topologias geradas com os dois tipos de marcadores. As análises foram corridas por $2 * 10^7$ gerações, amostradas a cada 1.000 gerações.

Delimitação de espécies

Para o levantamento de uma hipótese inicial (determinação de espécies candidatas), utilizei o método baseado em árvore *General Mixed Yule Coalescent* (GMYC; Pons et al., 2006). Este é um método que utiliza a topologia de árvores inferidas de um *locus* (em geral mtDNA) para modelar o ponto de transição entre cladogênese e coalescência de alelos, sob a premissa de que o primeiro ocorre com frequência muito menor que o segundo (Pons et al., 2006). Desta forma, busca-se detectar pontos ao longo da genealogia onde eventos ao

nível de espécie (e.g., especiação ou extinção) dão espaço a eventos ao nível de população por meio dos padrões de ramificação da árvore (Carstens et al., 2013). A extensão bayesiana do modelo (BGMYC), que permite a incorporação de incertezas filogenéticas na análise, foi aplicada com o pacote “BGMYC” (Reid e Carstens, 2012) em R (R Development Core Team, 2016) com uso de uma sub-amostra aleatória de 100 árvores resultantes da análise bayesiana mitocondrial em BEAST. Para cada árvore, o algoritmo MCMC foi corrido por 50.000 gerações, descartando as 40.000 primeiras pelo *burn-in*, e com amostragem a cada 100 gerações.

Teste coalescente de especiação

A probabilidade de especiação entre as espécies candidatas inferidas por BGMYC foi avaliada com o programa BAYESIAN PHYLOGENY AND PHYLOGEOGRAPHY (BP&P) que utiliza uma abordagem multi-espécies coalescente (Yang e Rannala, 2010). Este modelo implementa o algoritmo rjMCMC (*reversible jump Markov Chain Monte Carlo*) que calcula as probabilidades posteriores de modelos com diferentes números de espécies. De maneira simplificada, BP&P colapsa os nós presentes na árvore-guia, fornecida como *input*, de modo a testar modelos cujo número de espécies vai de 1 até o número máximo de terminais da árvore-guia. Essa análise tem como principais premissas que os terminais da árvore-guia (previamente delimitados) são grupos de indivíduos em panmixia e que não há fluxo gênico entre os terminais. A análise foi implementada em BPP 3.3 (Yang e Ranalla, 2014), com base nos alinhamentos de cada *locus* e os parâmetros tamanho populacional ancestral θ e tempo de divergência basal τ_0 (Leaché e Fujita, 2010; Yang e Rannala, 2010). BP&P estima o número de terminais (espécies) e a relação entre eles (árvore-de-espécies) ao mesmo tempo. Para a análise, foram utilizados os alinhamentos de cada gene nuclear, com um mínimo de três indivíduos por espécie candidata. Os parâmetros (*priors*) para a análise foram determinados seguindo o protocolo de Leaché e Fujita (2010) porém, atentando às recomendações de Rannala (2015) de não se utilizar parâmetros muito discrepantes (acima de uma ordem de magnitude) para comparar os possíveis cenários. Foi designada uma distribuição *gamma* para os *priors* e valores que simulam três cenários: populações ancestrais relativamente grandes $\theta \sim G(1, 100)$ e tempo de divergência basal longo $\tau_0 \sim G(1, 100)$, um segundo cenário que assume

populações ancestrais relativamente pequenas $\theta \sim G(2, 2000)$ e tempo de divergência basal recente $\tau_0 \sim G(2, 2000)$, e um cenário conservativo com $\theta \sim G(1, 100)$ e $\tau_0 \sim G(2, 2000)$. O algoritmo rjMCMC foi corrido por 100.000 gerações, sendo 10.000 descartadas pelo *burn-in* inicial. Cada modelo de delimitação foi indicado com probabilidade igual nos parâmetros. Diferentes corridas das análises e o uso dos dois algoritmos implementados no método geraram resultados consistentes.

Segregação de linhagens e hibridação

Para distinguir se eventuais discordâncias entre as filogenias mitocondrial e nuclear são devidas a segregação incompleta de linhagens ou hibridação, foi utilizado o método de Joly et al. (2009), implementado em JML 1.0 (Joly, 2012). Este tem como objetivo testar se a distância mínima observada entre um par de sequências é menor que a esperada para um cenário onde não há hibridização (Joly et al., 2009). Para tal, são simulados conjuntos de dados usando um modelo coalescente e as probabilidades posteriores de árvores-de-espécies geradas por *BEAST (Heled e Drummond, 2010), contendo informações sobre tamanhos populacionais e tempos de divergência dos ramos. São geradas inúmeras genealogias, e com base nestas, estimada uma distribuição de probabilidades posteriores de distâncias-mínimas entre os pares de espécies. No caso de a distância observada ser menor que 95% das distâncias mínimas simuladas, é possível rejeitar a hipótese de que apenas segregação incompleta de linhagens possa ter causado o padrão de divergência, sugerindo a presença de hibridação (Joly, 2012).

Para a análise, foram gerados dois conjuntos de dados: um alinhamento com as espécies candidatas de *Acratosaura* e *Stenolepis*, e outro contendo *Colobosaura*, *Iphisa*, e *Rondonops*, a fim de minimizar os pares de comparações nas simulações. Foram utilizados o gene mitocondrial ND4 e os genes nucleares PRLR, RAG-1 e DNAH3, por serem os mais variáveis (Tabela 2.2). Apenas foram incluídos indivíduos sem dados faltantes para os *loci* e as espécies candidatas representadas por mais de dois indivíduos nos alinhamentos finais. As árvores-de-espécies foram inferidas pelo método *BEAST implementado em BEAST 1.8, utilizando o modelo de especiação de Yule, um relógio molecular estrito com taxa fixada de mutação em 0,01 para ND4 e estimada nos *loci* restantes. Cada análise foi corrida por $4 * 10^7$ gerações, amostradas a cada 4.000 gerações, resultando

em 10.000 árvores. Cada *output* de *BEAST foi utilizado para a análise JML, junto com os alinhamentos originais. As simulações foram feitas com base em 100 árvores amostradas após a retirada de 5.000 por *burnin*, utilizando a taxa média do relógio molecular estimado em *BEAST como a taxa de mutação, o parâmetro de hereditariedade de 2.0 (diploide), e o modelo de substituição HKY+G.

Diferenciação morfológica

Para as análises morfológicas foram examinados exemplares depositados nas coleções herpetológicas do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP), Museu Nacional do Rio de Janeiro (MNRJ), Museu da Universidade Federal de Alagoas (MUFAL), e Universidade Regional do Cariri (URCA).

Nove medidas morfométricas lineares foram tomadas com auxílio de paquímetro digital (precisão de 0.1 mm): comprimento rostro-cloacal (CRC); comprimento do tronco entre membros (CEM); largura da cabeça (LCA); comprimento da cabeça (CCA); comprimento do fêmur (FEM); comprimento da tíbia (TIB); comprimento do pé, do calcanhar até a ponta do dedo mais longo (CPE); comprimento do úmero (UME); e comprimento do braço, do cotovelo à ponta do dedo mais longo (BRA). Foram feitas oito contagens de escamas: número de escamas dorsais (DOR), ventrais (VEN), escamas ao redor do corpo (CIN), gulares (GUL), lamelas subdigitais do quarto dedo (L4D), lamelas subdigitais do quarto artelho (L4A), fileiras de escamas transversais ao redor da base da cauda na terceira fileira após cloaca (ETC) e poros femorais em machos (POR). Obtive dados morfológicos de 226 exemplares, incluindo uma cobertura geográfica representativa para os seis gêneros de Iphisini atualmente reconhecidos. As medições foram transformadas no \log_{10} antes das análises, e indivíduos aberrantes (*outliers*) retirado após inspeção em gráficos *boxplot*. Sexos foram analisados separadamente. A presença de diferenciação morfológica entre as espécies candidatas delimitadas pelos métodos moleculares foi testada com duas abordagens. Primeiramente, a distribuição da variação morfológica na tribo foi explorada por análises de componentes principais (PCA), uma análise multivariada que procura os eixos que explicam a maior parte da variação no conjunto de dados, sendo útil para a visualização da distribuição dos indivíduos num espaço morfológico multidimensional (Manly,

2004). Foram utilizados todos os indivíduos de *Iphisini* medidos. Em seguida, as significâncias das diferenças em morfometria entre as espécies candidatas foram testadas para cada gênero separadamente com análises de variância multivariadas (MANOVA) e a presença de variação significativa em contagens de escamas entre espécies candidatas foi testada com o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, para cada gênero separadamente. As análises estatísticas foram realizadas em R (R Core Team 2016) utilizando 0,05 de significância.

RESULTADOS

Genealogia mitocondrial e espécies candidatas

A genealogia mitocondrial inferida apresentou alto suporte para os seis gêneros de *Iphisini*, e a monofilia das espécies atualmente reconhecidas para a tribo, exceto *Acratosaura mentalis* (parafilética em relação a *A. spinosa*) e *Iphisa elegans elegans*, polifilética em relação a *I. e. soinii* (Fig. 2.1). A análise BGMYC indicou trinta e cinco agrupamentos com $p > 0,90$ de representarem espécies (Fig. 2.2). Porém, um número elevado de espécies candidatas pode ser estimado quando a taxa de acumulação de espécies (diversificação) varia entre as diferentes linhagens, ou quando a representatividade da diversidade de cada linhagem é heterogênea (Fujisawa e Barraclough, 2013), especialmente se há linhagens com poucos ($n < 3$) indivíduos amostrados (Reid e Carstens, 2012). Desta forma, adotei um critério menos estrito, no qual dezesseis espécies candidatas são inferidas com $p > 0,50$ (Fig. 2.2), resultando em um modelo metodologicamente tratável e biologicamente mais realista. Nesta hipótese, eventos de especiação teriam ocorrido nos gêneros *Acratosaura*, *Iphisa* e *Rondonops*, com duas espécies candidatas para *Rondonops* (correspondendo às espécies já reconhecidas *R. biscutatus* e *R. xanthomystax*), quatro espécies para *Acratosaura* (duas candidatas além de *A. mentalis* e *A. spinosa*) e sete espécies candidatas para *Iphisa* (Fig. 2.1).

Apesar de não haver espécies candidatas inferidas para *Colobosaura* com base neste critério, a estruturação em dois clados separados por ramos relativamente longos, motiva que as duas linhagens (“oeste” e “leste”; Fig. 2.1) sejam utilizadas, de forma exploratória, nas análises subsequentes de validação. Não foram identificadas espécies candidatas para os gêneros *Stenolepis* e

Alexandresaurus. O número de espécies candidatas identificadas para *Iphisa* é elevado, porém concordante com resultados anteriores que indicam a existência de ao menos cinco linhagens contidas no que se conhece atualmente por *Iphisa elegans* (Nunes et al., 2012). Uma das linhagens identificada como espécie candidata por BGMYC (i.e., *Iphisa* sp. 3) ainda não foi explorada sob o ponto de vista anatômico. Porém, como o gênero se encontra em revisão taxonômica (P. Nunes com. pessoal), o grupo não será abordado de forma mais profunda nas análises subsequentes.

Discordância entre filogenia mtDNA e nuDNA

As espécies candidatas estimadas a partir da genealogia mitocondrial foram recuperadas como monofiléticas na filogenia *multilocus* nuclear, exceto *Acratosaura* sp. 2, que se mostrou parafilética em relação a *A. sp. 1* (Fig. 2.3). Em *Colobosaura*, algumas populações associadas com a linhagem “leste” na filogenia mitocondrial, aparecem relacionadas com a linhagem “oeste” na filogenia nuclear. A discordância entre genealogias é evidenciada também pelos baixos suportes estimados para as relações internas entre espécies candidatas de *Acratosaura* e *Colobosaura*. Apesar de não serem observadas discrepâncias entre as linhagens de *Iphisa*, os valores de suporte são baixos para a árvore de genes nucleares, e algumas linhagens são representadas por poucos indivíduos.

Teste coalescente de especiação

A análise BP&P estimou alta probabilidade de especiação ($p = 1,0$) para as quatro espécies candidatas de *Acratosaura* utilizando as três combinações de *priors*. O modelo estimou uma relação entre as espécies candidatas com *A. sp. 1* e *A. sp. 2* como espécies-irmãs, estas irmãs de *A. spinosa*, e as três como irmãs de *A. mentalis*. Diversas corridas dos modelos produziram resultados consistentes. Com a distribuição aleatória de indivíduos entre as linhagens, o modelo de delimitação de apenas uma espécie passou a ter probabilidade próxima a 1,0, assegurando que o algoritmo rjMCMC está misturando adequadamente (Yang & Rannala, 2010).

No caso de *Colobosaura*, os indivíduos foram agrupados conforme as três linhagens observadas na filogenia de nuDNA (Fig. 2.3). A análise estimou como mais provável o modelo com três espécies, porém com baixas probabilidades posteriores ($p < 0,8$) e estimou uma probabilidade de especiação $p < 0,9$ para cenários com população ancestral grande. No cenário com população ancestral

pequeno e tempo de divergência basal recente, a probabilidade do modelo de três espécies foi maior ($p \sim 0,9$) porém a maior probabilidade de especiação estimada foi de $p = 0,95$ em diversas corridas do algoritmo. Assim, o suporte para a hipótese de mais de uma espécie em *Colobosaura* é fracamente sustentada pelas análises de BP&P. Com a distribuição aleatória de indivíduos entre as linhagens, o modelo de delimitação de apenas uma espécie passou a ter probabilidade próxima a 1,0.

Teste de hibridação

A análise JML inferiu para o primeiro conjunto de dados, distâncias entre linhagens simuladas menores que a observada em menos de 60% das simulações para todas as comparações, exceto *Acratosaura* sp. 1 x *Acratosaura* sp. 2 (98,6%). O modelo de cladogênese sem hibridação pôde ser rejeitado apenas para este par de espécies ($p = 0,44$).

Para o segundo conjunto de dados, as probabilidades de distâncias entre linhagens menores que as observadas representaram menos de 5% para todas as comparações, portanto, não foi possível rejeitar a hipótese de que apenas segregação incompleta de linhagens (cladogênese sem hibridação) possa ser responsável pela discrepância observada entre as genealogias com diferentes tipos de marcadores (e.g., *Colobosaura*). No entanto, por falta de amostragem não foi possível explorar a possibilidade de hibridação entre linhagens de *Iphisia*.

Diferenciação morfométrica

Os dois primeiros componentes principais estimados pela análise de PCA com dados morfométricos de *Iphisini*, tanto para machos quanto fêmeas, foram responsáveis por mais de 96% da variação (Tabela 2.3.). Para ambos os sexos, o primeiro componente ($> 90\%$) teve correlação alta e positiva com todos caracteres, portanto representou um eixo de tamanho. O segundo componente explicou uma fração da variação (3,7-6,1%), e demonstrou um contraste, ou seja, sinais opostos entre coeficientes representados por medidas de comprimento do corpo (SVL e CEM) e dimensões dos membros (FEM, TIB, CPE, UME e BRA) (Tabela 2.3). No espaço morfológico delimitado pelos dois primeiros componentes principais é possível observar uma separação em grupos morfológicos, porém pouca diferenciação intragenérica (Fig. 2.4.). Não houve diferenciação significativa em morfometria entre as espécies candidatas de *Acratosaura* tanto para machos (MANOVA, Wilks' $\Delta = 0,07$; $F_{(36,61)} = 1,77$; $p =$

0,054) quanto para fêmeas (MANOVA, Wilks' $\Delta = 0,23$; $F_{(18,28)} = 1,78$; $p = 0,08$). Houve diferenciação significativa em morfometria entre as duas linhagens de *Colobosaura*, tanto para machos (MANOVA, Wilks' $\Delta = 0,64$; $F_{(9,49)} = 3,10$; $p < 0,01$) quanto para fêmeas (MANOVA, Wilks' $\Delta = 0,46$; $F_{(9,27)} = 3,54$; $p < 0,01$). Não houve diferenciação em contagens de escamas entre espécies candidatas de *Acratosaura* (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$), porém houve diferenças significantes em *Colobosaura* em DOR, VEN e L4D (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$).

Tabela 2.3. Resultados da análise de Componentes Principais (PCA) sobre nove medidas morfométrica \log_{10} transformadas de dezesseis espécies candidatas pertencentes a seis gêneros de Iphisini.

	Machos N= 132		Fêmeas N = 95	
	PC1	PC2	PC1	PC2
CRC	0,974	-0,190	0,946	0,314
CEM	0,941	-0,252	0,882	0,465
LCA	0,953	-0,196	0,965	-0,009
CCA	0,970	-0,176	0,965	0,059
FEM	0,981	0,010	0,984	-0,036
TIB	0,985	0,098	0,985	-0,119
CPE	0,941	0,300	0,963	-0,225
UME	0,955	0,145	0,961	-0,158
BRA	0,944	0,280	0,944	-0,292
Autovalores	0,067	0,003	0,074	0,005
% da variância	92,42	3,97	91,02	6,13

DISCUSSÃO

Os resultados das análises de delimitação de espécies implementadas neste capítulo suportam a hipótese de que há diversidade ainda não reconhecida em Iphisini. No caso de *Acratosaura*, a evidência molecular é robusta tanto com métodos baseados em árvores filogenéticas, quanto com modelos coalescentes. No entanto, é notável o fato de a diversidade se revelar heterogeneamente distribuída na tribo. Os resultados obtidos em trabalhos anteriores com *Iphisa*, onde foram inferidas cinco espécies (quatro candidatas), com estrutura genética e diferenciação em anatomia dos hemipênis (Nunes, 2011; Nunes et al., 2012) naturalmente levaram à expectativa de que uma estrutura semelhante fosse revelada em *Colobosaura*, pela proximidade filogenética e também ampla distribuição geográfica.

Apesar de a tribo Iphisini ser composta em sua maioria por espécies habitantes estritas de ambientes florestados, o gênero *Colobosaura* ocupa diferentes habitats do mosaico que caracteriza as paisagens das formações abertas sul-americanas, com ocorrência pontual no semi-árido nordestino (Freire et al., 2012). A baixa estrutura genética observada, porém, sugere que a diversificação é recente, e possivelmente a espécie apresentou uma expansão geográfica intensa em curto espaço de tempo, favorecida pela rede complexa de matas de galerias e outras formações florestais ao longo do Cerrado e Caatinga.

Acratosaura, no entanto, experimentou uma diferenciação genética significativa, com linhagens ocupando diferentes espaços ambientais: uma linhagem associada a relevos baixos da Caatinga (*A. mentalis*) e, outras três (incluindo *A. spinosa*), associadas a regiões montanhosas elevadas e planaltos adjacentes à cadeia do Espinhaço. A estrutura genética profunda observada nestas últimas linhagens, e as evidências de possíveis eventos de hibridação, revelaram um padrão complexo de diversificação. Para este caso, o modelo clássico de especiação por isolamento geográfico parece tão plausível quanto um de especiação com fluxo gênico. Portanto, a diversificação do grupo pode ser melhor avaliada por uma abordagem analítica em nível populacional, objetivo do capítulo 4.

Também surpreende a baixa estrutura genética revelada para *Alexandresaurus* e *Stenolepis*, que por hora, suporta o status de monotípico de ambos. *Alexandresaurus* ocorre na região costeira do sul da Bahia, o “Corredor Central da Mata Atlântica”, reconhecida por ser uma área caracterizada por estabilidade climática histórica e complexidade geológica, que teria favorecido o acúmulo de diversidade genética em diversos grupos (Carnaval e Moritz, 2008; Carnaval et al., 2009). *Leposoma* é um exemplo de lagarto microteídeo que diversificou intensamente na região (Rodrigues et al., 2002; Pellegrino et al., 2011; Rodrigues et al., 2013) e contrasta com o que é observado em *Alexandresaurus*.

A distribuição de *Stenolepis* pode ser considerada relictual por compreender, em sua maioria, fragmentos de florestas em regiões acidentadas do Nordeste brasileiro, circundadas por planícies cobertas por vegetação xérica (Rodrigues, 2003). Estes fragmentos teriam sido isolados por consequências da aridificação experimentada pela região ao longo do período Quaternário, que teria reduzido

a presença de florestas na Caatinga (Oliveira et al., 1999). Desta forma, é possível supor que apenas isolamento geográfico não foi suficiente para favorecer a diferenciação das populações, ao menos nesta escala de tempo. Porém, outros grupos de lagartos microteídeos apresentam endemismos para estes relictos florestais (Rodrigues e Borges-Nojosa 1997; Borges-Nojosa et al., 2016). Assim, uma análise comparativa é necessária para clarificar se há associação histórica entre os eventos de isolamento provocados pela aridificação do clima e a diversificação dos microteídeos na região.

Os resultados das análises de morfometria confirmam também o caráter conservativo da morfologia das espécies de *Iphisini*. Mesmo com profunda estrutura genética, *Acratosaura* e *Iphisa* mostram pouca dispersão no espaço multivariado das medições morfométricas. De fato, à exceção de *Rondonops*, boa parte da diferenciação morfométrica em *Iphisini* se manifesta em nível intergenérico. Mesmo em contagens de escamas, as diferenças em nível intragenérico são sutis e as espécies são reconhecidas principalmente com base em características qualitativas de escamação e padrão de coloração (Rodrigues et al., 2009a; Colli et al., 2015) ou anatomia interna (Nunes et al., 2012).

Desta forma, os resultados da abordagem molecular aplicada neste capítulo exemplificam como os métodos quantitativos para delimitação de espécies podem auxiliar a taxonomia de grupos onde há pouca variação morfológica. No entanto, é válido destacar que, apesar de haver uma variedade de métodos disponíveis para delimitação, que permitirem um acesso rápido e objetivo de espécies potenciais, virtualmente todos apresentam pressupostos que devem ser levados em consideração na interpretação dos resultados e na tomada de uma decisão taxonômica (Carsten et al., 2013; Rannala, 2015).

O método bGMYC por exemplo, por aplicar modelos sobre o padrão de ramificação das árvores para inferir um número de linhagens (Fujisawa e Barraclough, 2013), é sensível à amostragem de terminais e tende a superestimar o número de espécies em filogenias com topologias heterogêneas (Bergsten et al., 2012; Talavera et al., 2013). Como é empregado, em geral, para um *locus* único, também é sensível à segregação incompleta de linhagens, e requer métodos de validação (Carstens et al., 2013).

BP&P é um dos métodos moleculares de delimitação mais utilizados, e aplica uma abordagem probabilística coalescente para testar diferentes

hipóteses de especiação e, por concomitantemente inferir a árvore-de-espécies, lida bem com segregação incompleta de linhagens (Yang e Ranalla, 2014). O modelo empregado é do tipo “multi-espécies coalescente”, usa como critério básico a inferência de isolamento genético entre linhagens e define como espécie qualquer população suportada como distinta em uma árvore-de-espécies (Yang e Ranalla, 2010). Assim, o método assume explicitamente um limiar de restrição ao fluxo-gênico como critério para delimitação de espécies que tende a detectar eventos ainda incipientes de especiação (Rannala, 2015).

Em geral, os métodos moleculares para delimitação apresentam uma grande quantidade de simplificações em seus modelos, uma vez que o conjunto de parâmetros relevantes para o processo de diferenciação de espécies é extremamente grande e complexo, o que faz com que diferentes tipos de métodos comumente produzam resultados incongruentes (Carstens et al., 2013; Kuchta et al., 2016). Por este motivo, muitos pesquisadores têm adotado em seus trabalhos a abordagem de se comparar várias metodologias para testar se os arranjos taxonômicos resultantes são congruentes entre diferentes algoritmos (Carstens et al., 2013; Miralles e Vences, 2013). No entanto, a comparação entre delimitações de diferentes metodologias que empregam os mesmos modelos, algoritmos e conjuntos de evidências, tem sido criticada, por não necessariamente garantir a qualidade dos resultados, e não substituir a escolha justificada de um modelo com interpretação crítica de seus resultados (Ranalla, 2015). Dada a complexa dinâmica espacial e temporal do surgimento de espécies, têm-se sugerido como a forma mais eficiente de delimitar espécies, a avaliação qualitativa conjunta de distintas linhas de evidências (Dayrat, 2005; Padial et al., 2010).

Os resultados moleculares deste trabalho indicam duas espécies candidatas para *Acratosaura*, além das duas espécies atualmente descritas (Rodrigues et al., 2009a) e duas espécies candidatas para *Iphisa*, além das cinco reconhecidas em um trabalho anterior (Nunes et al., 2012), das quais apenas uma está formalmente descrita, com duas subespécies (Dixon, 1974). *Acratosaura* apresenta baixa variação em caracteres morfológicos quantitativos, no entanto, quando comparada a *A. mentalis* e *A. spinosa*, as duas espécies candidatas são diferenciadas pelo espaço eco-geográfico ocupado (i.e., regiões planálticas x depressão nordestina) e por caracteres morfológicos qualitativos (Rodrigues et

al., 2009). A profunda diferenciação molecular sugere a independência evolutiva destas quatro linhagens.

No entanto, a delimitação de duas espécies novas em *Acratosaura*, apesar de sustentadas pelos métodos moleculares, é complicada não só pelo conservadorismo morfológico, quanto pela estrutura espacial complexa com evidências de hibridação. O método coalescente (BP&P), apesar de ser considerado sensível a migração (Leaché et al., 2014), foi capaz de reconhecer as duas linhagens como independentes. Talvez se deva ao fato de que boa parte da incongruência entre genealogias ocorre em populações de uma faixa de contato entre a distribuição norte (baiana) e sul (mineira) do grupo ao longo da cadeia do Espinhaço, que pode constituir uma zona híbrida estreita. Por outro lado, as duas linhagens parecem ter acumulado diferenças genéticas significativas mesmo na presença de fluxo gênico. Sabe-se que isolamento reprodutivo não é necessariamente um mecanismo limitante para a diversificação em algumas linhagens de Gymnophthalmidae e seu grupo-irmão Teiidae, e de fato há exemplos de diferenciação com fluxo gênico (Rosenblum, 2006; Oliveira et al., 2015) e de linhagens assexuais originadas por hibridação (Cole et al., 1988; Yonenaga-Yassuda et al., 1995; Kizirian e Cole, 1999; Pellegrino et al., 2011). No entanto, ainda é necessária uma abordagem populacional mais profunda e suporte de outras linhas de evidência (ecológicos, morfológicos qualitativos) para atestar pela diferenciação destas duas linhagens.

No caso de *Iphisa*, a consideração de sete linhagens é ainda preliminar, uma vez que a delimitação é derivada apenas do método genealógico (bGMYC) e a amostragem populacional é heterogênea. Como estão em andamento para o gênero uma abordagem populacional mais profunda (Fouquet, dados não publicados) e uma revisão morfológica (Nunes, com. pess.), as análises deste capítulo visam principalmente delimitar as outras espécies da tribo, e ter uma estimativa geral e comparativa da diversidade em *Iphisa*.

A baixa diversidade revelada nos outros gêneros, à primeira vista, sugere que há uma variação grande na taxa de diversificação entre clados. No entanto, a grande discrepância na estruturação entre as linhagens pode também ser consequência de uma representação irregular das populações, seja por extinções, ou por falha de amostragem da diversidade real em campo. Tendo em conta que uma parte significativa das espécies de Iphisini apenas foram

descobertas e formalmente descritas nos últimos vinte anos (Rodrigues et al., 2007, 2009a; Colli et al., 2015) a hipótese de que espécies potenciais não estejam representadas nestas análises tem alta probabilidade. No entanto, é apresentado aqui uma primeira estimativa quantitativa da diversidade de Iphisini, e do seu padrão de distribuição, que pode servir de base para análises comparativas posteriores.

FIGURAS

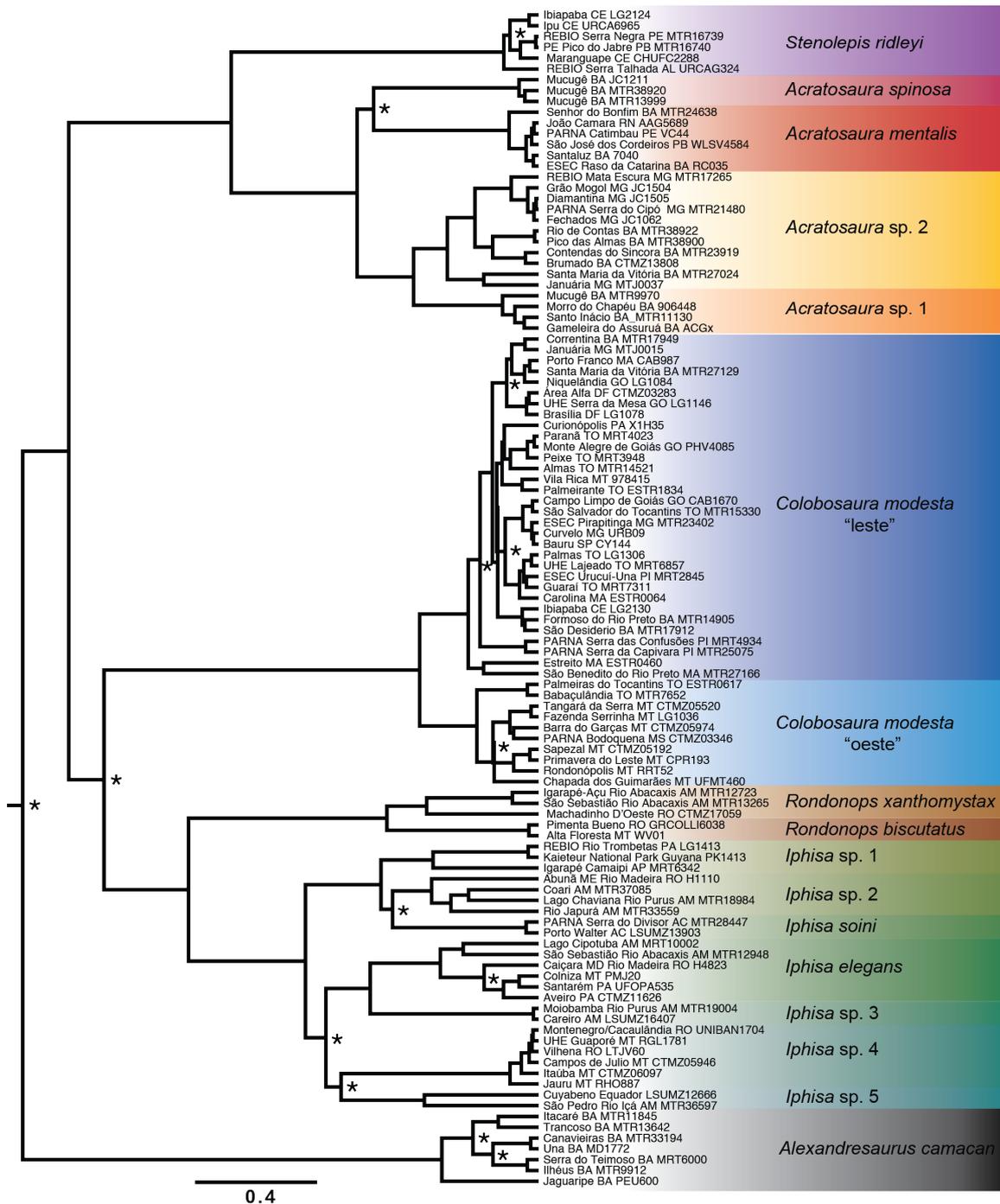


Figura 2.1. Filogenia mitocondrial ultramétrica de Iphisini (16S+ND4, 1230pb) destacando as espécies candidatas delimitadas pela análise BGMYC. Probabilidades posteriores inferiores a 0,95 estão indicadas por asteriscos.

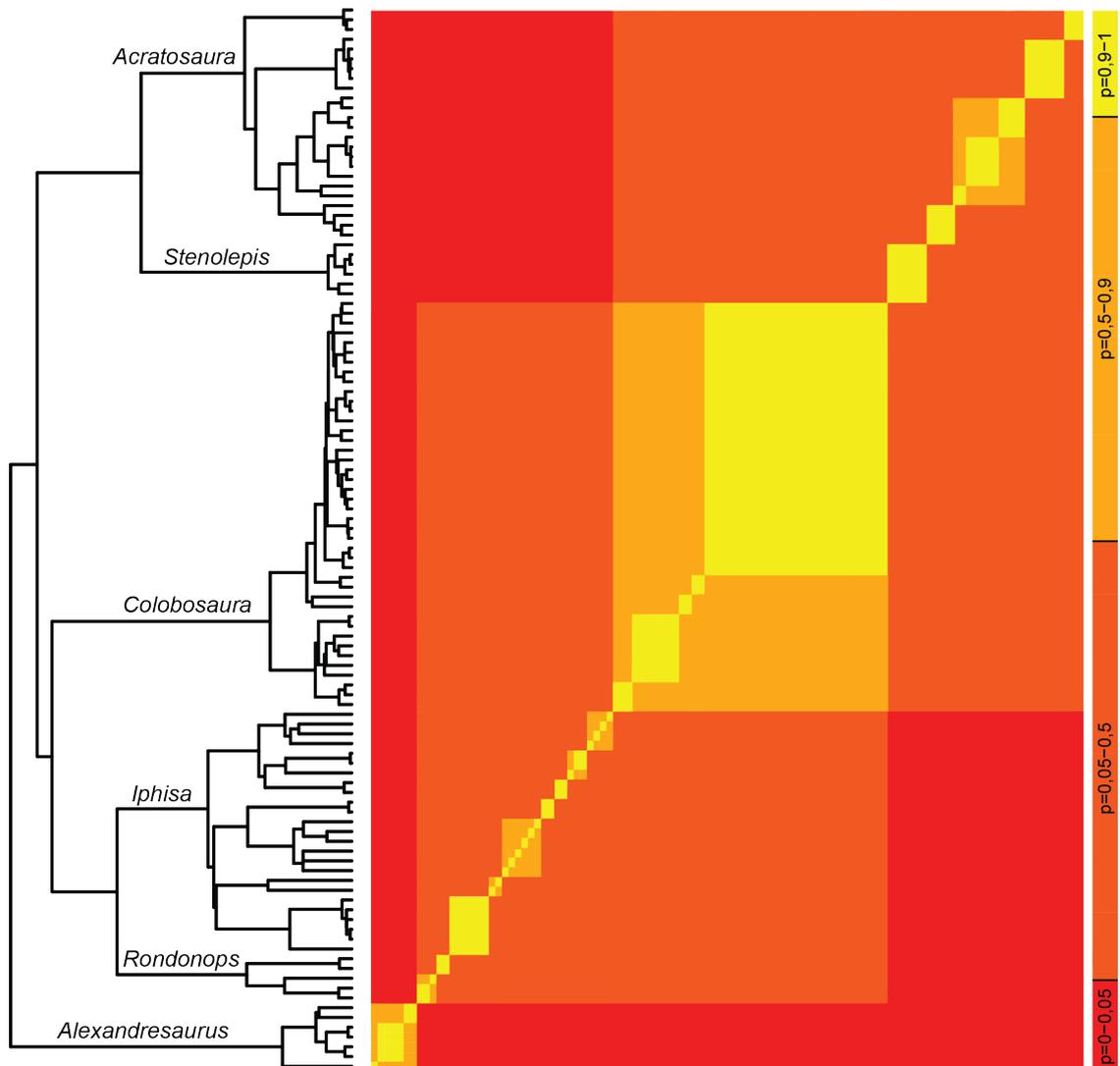


Figura 2.2. Árvore ultramétrica mitocondrial de Iphisini (16S+ND4, 1230pb) estimada com BEAST (à esquerda) e a matriz de cores com as probabilidades de linhagens representarem espécies candidatas estimadas pela análise BGMYC (à direita).

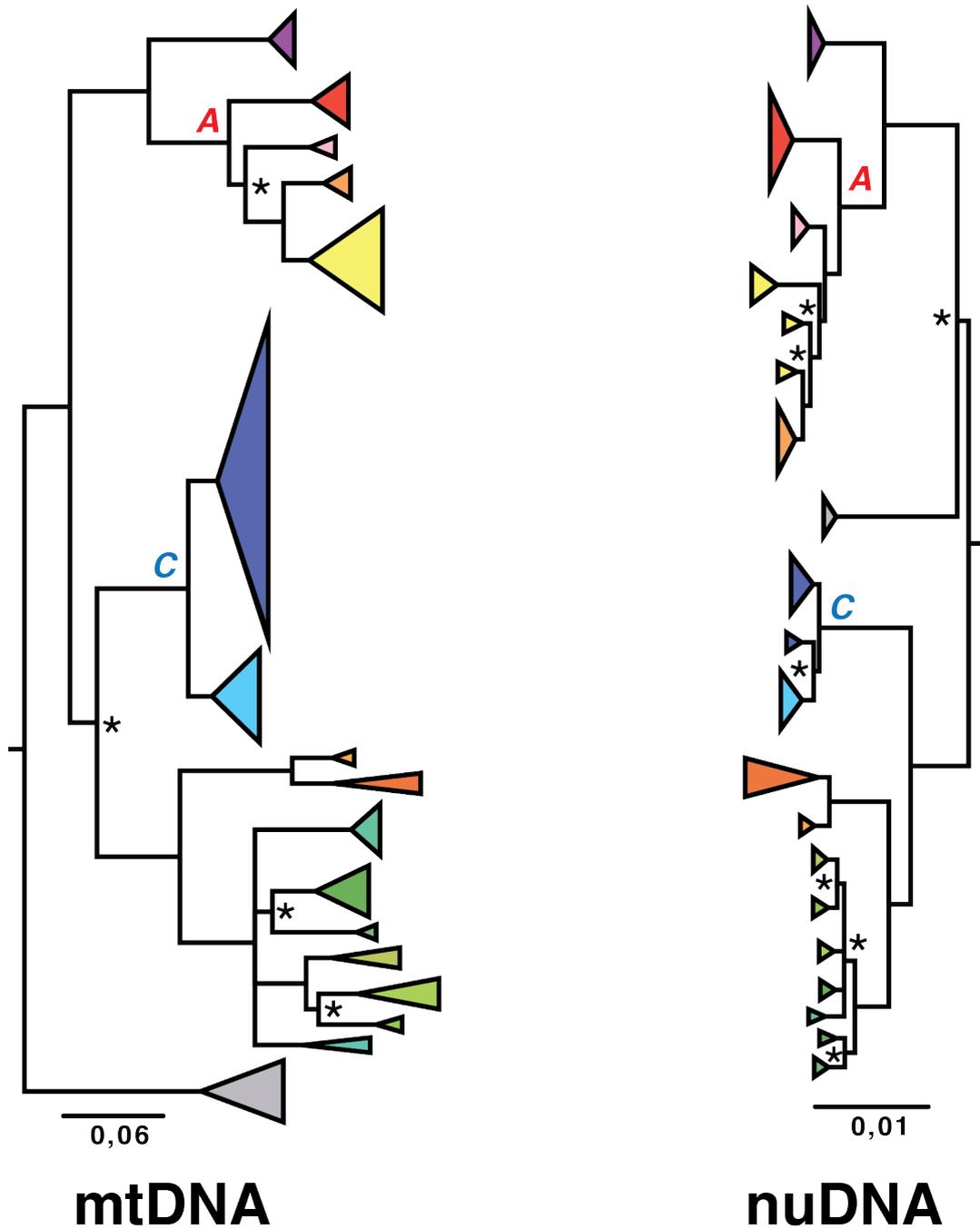


Figura 2.3. Comparação entre genealogia mitocondrial e filogenia nuclear *multilocus* de Iphisini inferidas com MRBAYES, onde probabilidades posteriores inferiores a 0,95 estão indicadas por asteriscos. Cores correspondem às espécies candidatas delimitadas anteriormente. Estão destacadas em letras coloridas os gêneros *Acratosaura* (A) e *Colobosaura* (C).

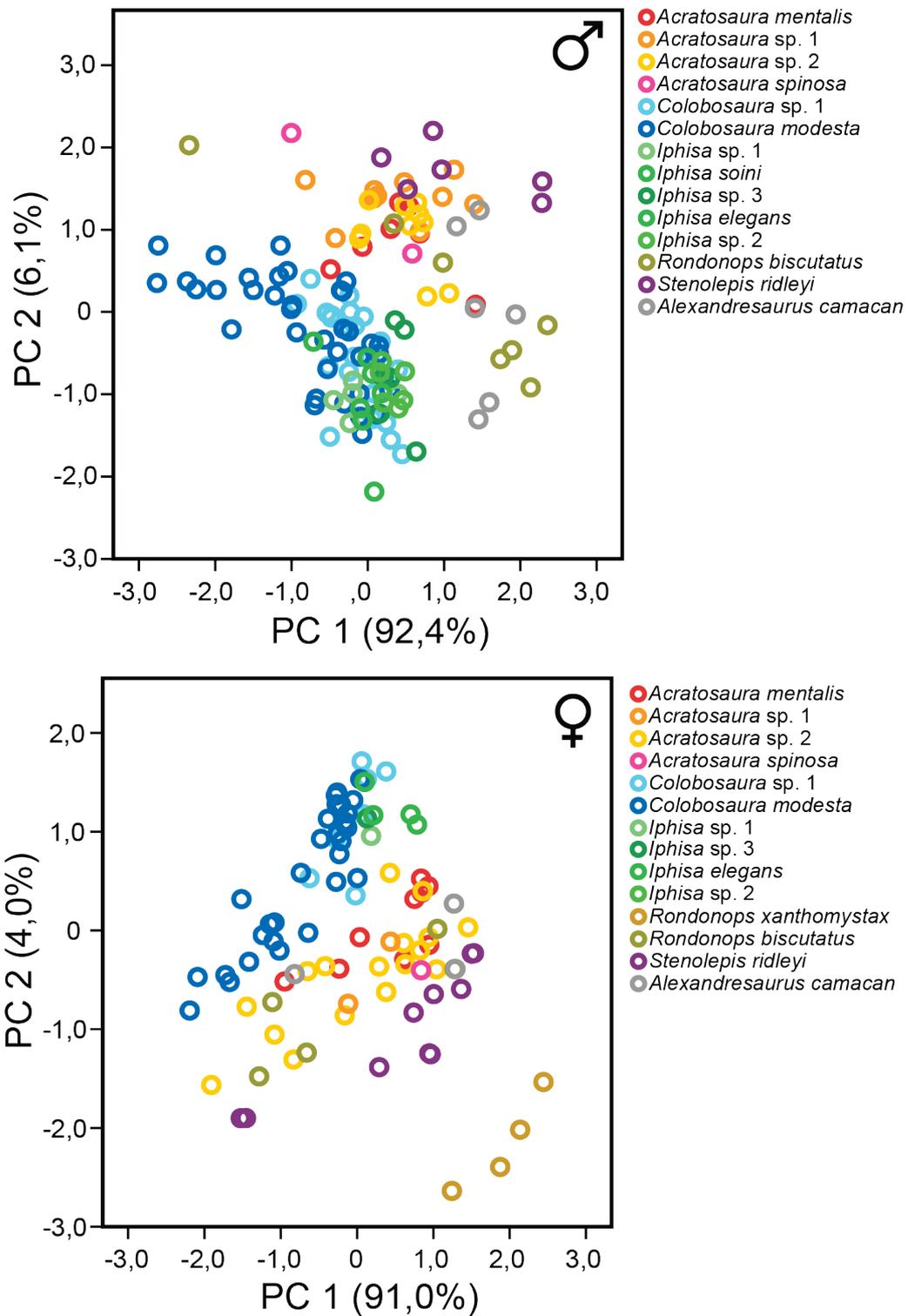


Figura 2.4. Resultados de PCA mostrando a distribuição das espécies candidatas de Iphisini delimitadas no espaço morfológico definido pelos dois primeiros componentes principais, a partir de nove variáveis morfométricas. São mostrados resultados para machos (acima) e fêmeas (abaixo) separadamente.

CAPÍTULO 3. PADRÕES FILOGENÉTICOS DE DIVERSIFICAÇÃO E DISPARIDADE MORFOLÓGICA EM LAGARTOS DA SUBFAMÍLIA GYMNOPHTHALMINAE.

INTRODUÇÃO

Um objetivo central em macroevolução é revelar os padrões de diversificação, ou seja, o balanço entre os eventos de especiação e extinções em linhagens ao longo do tempo (Futuyma, 2009). O campo de estudo é tradicionalmente associado à paleontologia, e guiado por evidências obtidas do registro fóssil (Simpson, 1944; Rensch, 1959). No entanto, abordagens macroevolutivas têm ganhado expressão em campos “neontológicos” de pesquisa em decorrência do desenvolvimento de métodos analíticos comparativos baseados em filogenias moleculares temporalmente calibradas, que permitem inferir padrões históricos de diversificação de grupos recentes (Purvis, 1996; Ricklefs, 2007; Morlon, 2014). Estas abordagens têm ajudado a explorar questões históricas profundas como os efeitos de diferentes modos de diversificação sobre a riqueza e disparidade fenotípica de linhagens (Harmon et al., 2003; Ricklefs, 2010; Pyron & Burbrick, 2013; Rabosky, 2014) e como diferentes linhagens tendem a responder diferencialmente às mudanças climáticas (Kozak e Wiens, 2010).

Os répteis escamados representam um grupo modelo para estudos de especiação, adaptação e evolução fenotípica (Camargo et al., 2010; Losos, 2011; Pyron & Burbrick, 2012). Um padrão emergente notável no grupo é a evolução recorrente e independente de formas de corpo serpentiformes em diversos clados de lagartos (Wiens et al., 2006; Brandley et al., 2008). Este é o caso de Gymnophthalminae, uma subfamília de lagartos microteídeos composta por três tribos, mas no qual um padrão de corpo serpentiforme, com extremo alongamento e redução e/ou perda total de membros, se desenvolveu apenas na tribo Gymnophthalmini (Pellegrino et al., 2001; Rodrigues e Santos, 2008). Um alongamento de corpo com redução relativa de membros também ocorreu no gênero *Heterodactylus* (Heterodactylini) onde, à semelhança das espécies serpentiformes, são observadas fusões de escamas cefálicas e perda de ouvido

externo (Rodrigues et al., 2009b). Porém, a “síndrome” do padrão de corpo serpentiforme não é observada em nenhuma espécie da tribo Iphisini.

O contexto ecológico do desenvolvimento de corpos serpentiformes tem sido estudado em microteídeos (Grizante et al., 2012; Camacho et al., 2014). Demonstrou-se, por exemplo, uma associação entre alongamento do corpo com redução de membros e climas áridos (Grizante et al., 2012; Recoder et al., 2013). Foi sugerida também a evolução de forma serpentiforme como uma adaptação a habitats nos quais condições de temperaturas extremas aliadas à oportunidade ecológica oferecida por solos arenosos, favorecem a presença de espécies com atividade fossorial (Camacho et al., 2014). No entanto, o tempo e taxa de evolução fenotípica não foram explorados de forma que se possa avaliar como a história, por meio de padrões individuais de especiação, se relaciona com a disparidade morfológica observada no grupo (Harmon et al., 2003).

Desta forma, este capítulo tem como objetivos: testar se a taxa de diversificação (acumulo de espécies) é constante ou variável ao longo da história de Gymnophthalminae; testar se há relação entre taxa de diversificação e taxa de evolução morfológica em Gymnophthalminae; e testar se taxas de diversificação e disparidade morfológica diferem entre as tribos Gymnophthalmini, Heterodactylini e Iphisini.

MATERIAL E MÉTODOS

Filogenia de Gymnophthalminae

Uma árvore filogenética temporalmente calibrada foi inferida com o programa BEAST 1.8 (Drummond et al., 2012) utilizando uma matriz concatenada composta por quatro genes mitocondriais (12S, 16S, Cyt-b, ND4) e seis genes nucleares (cmos, NTF3, DNAH3, PRLR, RAG1 e PNN). Estes marcadores são os mesmos utilizados no capítulo 2 com exceção dos genes mitocondriais 12S (RNA ribossomal 12S) e Cyt-b (citocromo b), e o exon nuclear PNN (pinina), que foram amplificados com pares de *primers* e condições apresentados na tabela 3.1. Os métodos para extração de DNA, amplificação e sequenciamento seguiram os passos descritos no capítulo 2.

Tabela 3.1. Marcadores moleculares selecionados para complementar a amostragem de loci das análises deste capítulo. São apresentadas informações sobre o tipo de gene, os *primers* utilizados, a temperatura de anelamento e as respectivas referências.

Gene	Tipo	Primers	T°C	Referência
Cyt-b - Citocromo B	mtDNA (codificante)	LGL765: 5' GAAAAACCAAYCGTTGTWATTCAACT 3' CB5L: 5' GCCAACGGCGCATCCTTCTTCTT 3' CB1: 5' CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA 3' CB3: 5' GGCAAATAGGARRTATCATTC 3'	51	Meyer, 1993 (LGL765), Bickham et al., 1995 (CB5), Palumbi, 1996 (CB1 e CB3)
12S - RNA ribossomal 12S	mtDNA (ribossomal)	12Sa: 5' CTGGGATTAGATACCCCACTA 3' 12Sb: 5' TGAGGAGGGTGACGGGCGGT 3'	56	Harris et al., 1998
PNN - Pinin, proteína associada a desmossomo	nuDNA (Exon)	PNN_F1: 5' TTTGCAGARCARATAAAAYAAAATGGA 3' PNN_R1: 5' AACGCCTTTTGTCTTTCTGTCTGATT 3'	53	Townsend et al., 2008

As sequências foram editadas e alinhadas preliminarmente com o programa GENEIOUS 6.1 (Kearse et al., 2012). Os alinhamentos finais foram feitos com CLUSTALW 2.1 (Larkin et al., 2007), com parâmetros padrões. Os genes codificadores de proteína foram traduzidos em aminoácidos para servir como guia para os alinhamentos, e as sequências de DNA originais utilizadas nas análises. O programa GBLOCKS 0.91b (Castresana, 2000) foi utilizado para eliminar sítios mal alinhados. As heterozigoses dos marcadores nucleares foram resolvidas com PHASE 2.1 (Stephens et al., 2001) para cada alinhamento individual, implementado em DNASP 5.1 (Librado & Rozas, 2009) conforme descrito no capítulo 2.

Os alinhamentos individuais foram concatenados com SEQUENCEMATRIX 1.7 resultando em uma matriz final com 6213 pb (61% completa), representada por 42 espécies de Gymnophthalminae e cinco grupos externos (Apêndice 2). Apenas quatro espécies reconhecidas na subfamília foram faltantes: *Gymnophthalmus lineatus*, *G. cryptus*, *Tretioscincus bifasciatus* e *Heterodactylus septentrionalis*, portanto, 91% da diversidade atualmente conhecida do grupo (incluindo as espécies candidatas delimitadas no capítulo 2) está representada nas análises.

Os modelos de evolução nucleotídica foram estimados para cada *locus* independentemente com o programa JMODELTEST 2.1 (Darriba et al., 2012) e o

melhor modelo foi selecionado com o critério de Akaike (AIC) (Burnham e Anderson, 2002). A matriz final foi importada e os parâmetros da análise definidos com o programa BEAUTI 1.8 (Drummond et al., 2012). Foram definidas partições para cada *locus* e atribuídos os respectivos melhores modelos de evolução: GTR+I+G para 12S, 16S, Cyt-b e ND4; GTR+G para DNAH3, NTF3 e Rag-1; HKY+I+G para c-mos, HKY+G para PRLR e GTR+I para PNN. Foram selecionados como parâmetros um modelo de relógio molecular relaxado, *uncorrelated relaxed lognormal clock* (UCLN) com taxa fixada em 0,01 em ND4 e Cyt-b e estimada para outros *loci*, e um modelo de diversificação constante *Birth-Death* (BD). Como não existem fósseis conhecidos para a família Gymnophthalmidae que sirvam de pontos de calibração para estimar tempos absolutos de divergência na filogenia, a taxa utilizada de 1% é arbitrária. Portanto, os resultados de tempo de diversificação são considerados como relativos. A análise foi corrida por 10^8 gerações e amostrada a cada 10.000 gerações. A convergência de cadeias, estacionaridade e tamanhos de amostra efetivos altos ($ESS > 200$) foram inspecionadas em TRACER 1.6 (Rambaut et al., 2014).

Taxas de diversificação

Os padrões de diversificação para Gymnophthalminae foram observados com gráficos de linhagem por tempo (LTT: *lineages-through-time plots*) usando o pacote GEISER (Harmon et al., 2003) em R (R Development Core Team, 2016). Com base na filogenia estimada, foram testados cinco modelos de diversificação: dois modelos de taxa constante de diversificação (*pure-birth* e *birth-death*) e três modelos de taxas-variáveis de diversificação (*diversity-dependent logistic model*, *diversity-dependent exponential model* e *Yule-2-rate bi-variable model*) com LASER (Rabosky, 2006a) em R.

O modelo *pure-birth* (PB) ou “espeiação pura”, prediz que os eventos de espeiação são constantes ao longo da história de uma linhagem, sem que haja uma taxa de extinção significativa (Yule, 1924). O modelo *birth-death* (BD) ou “espeiação-extinção” considera também uma taxa de diversificação constante, porém com espeiação $\lambda > 0$ e extinção $\mu > 0$ (Morlon, 2014). O modelo dependente-de-densidade logístico (*diversity-dependent logistic model*, DDL) modela mudanças (quedas) na taxa de espeiação de acordo com um modelo logístico de crescimento populacional, dependente do número de linhagens em

um dado tempo (Blankers et al., 2013). No modelo dependente-de-densidade exponencial (*diversity-dependent exponential model*, DDX) a taxa de especiação depende, além do modelo de crescimento e número de linhagens em um determinado tempo, da magnitude de mudança na taxa inicial (Blankers et al., 2013). No modelo multi-taxas *Yule-2-rate* (Y2R) é considerada uma taxa inicial constante, uma taxa final constante, porém um ponto abrupto de mudança na taxa, por otimização (Rabosky, 2006b).

Para a seleção do melhor modelo de diversificação foi utilizado o critério de Akaike (AIC) com base nas diferenças entre os scores entre os diferentes modelos (Δ AIC) (Burnham & Anderson, 2002). Porém, conforme sugerido por Rabosky (2006b), o melhor modelo constante foi comparado diretamente com o melhor modelo variável, ao invés de se inferir conjuntamente qual o melhor entre todos os modelos utilizados.

As possíveis mudanças em taxas de diversificação foram estimadas com a função MEDUSA (Alfaro et al., 2009) do pacote GEISER em R. Este método implementa um modelo constante na árvore e calcula sequencialmente modelos mais complexos adicionando mudanças de taxas em diferentes nós das árvores a cada passo. O melhor modelo para número de mudanças é selecionado quando o incremento do AIC é <4 (Alfaro et al., 2009).

Morfometria e disparidade

Cinco medidas morfométricas lineares foram tomadas com uso de paquímetro digital (resolução 0,1 mm), conforme descrito no capítulo 2: comprimento rostro-cloacal (CRC), comprimento do tronco entre membros (CEM), largura da cabeça (LCA), comprimento da cabeça (CCA) e comprimento da cauda não-regenerada (CAU). Devido à redução de membros apresentada em algumas das espécies, com a perda total dos membros anteriores em *Calyptommatius*, foi utilizada apenas uma medida para representar tamanho de membros: o comprimento total do membro posterior estendido, medido da raiz da coxa até a ponta do artelho mais longo (CMP). As medidas foram obtidas de 370 exemplares preservados, representando 40 das 42 espécies de Gymnophthalminae incluídas na filogenia (média de 9,5 exemplares/espécies). As medições foram transformadas no \log_{10} e a média calculada para cada espécie. Devido à alta correlação $r > 0,9$ entre algumas das variáveis, e baixa

proporção de caudas completas, foram mantidas para as análises apenas: CRC, CEM, CCA e CMP.

O comprimento rostro-cloacal foi utilizado como medida de tamanho de corpo nas análises. Uma análise filogenética de componentes principais (phyPCA; Revell, 2009) foi realizada utilizando uma matriz de covariância das quatro variáveis morfométricas restantes. O primeiro componente principal (84,9% da variação) teve correlação alta com CRC ($r > 0,9$) e todas as variáveis tiveram scores positivos e significantes (Tabela 3.2), representando também, tamanho. O segundo componente principal (13,8% da variação) teve correlação alta e positiva com CEM e correlação alta e negativa com CMP (Tabela 3.2) sendo usado, portanto, como uma medida de forma nas análises.

Tabela 3.2. Resultados de uma Análise Filogenética de Componentes Principais (phyPCA) sobre a matriz de covariância das médias de três variáveis morfométricas para 40 espécies de Gymnophthalminae.

	PC1	PC2	PC3
CEM	-0,8724	0,4777	0,1040
CCA	-0,9729	0,1382	-0,1854
CMP	-0,9230	-0,3819	0,0474
Autovalores	0,0530	0,0086	0,0008
Variação (%)	84,94	13,76	1,30

Os padrões de disparidade morfológica entre os clados em tamanho (CRC) e forma (PC2) foram visualmente explorados com gráficos de disparidade por tempo (*disparity-through-time plots*) produzidos com o pacote GEISER (Harmon et al., 2003) em R.

Mudanças em taxas de diversificação e evolução morfológica

A presença de mudanças em taxas de evolução morfológica ao longo do tempo foram exploradas com BAMM (*Bayesian Analysis of Macroevolutionary Mixtures*; Rabosky, 2014), um método bayesiano que modela transições entre diferentes regimes macroevolutivos ao longo de uma árvore, buscando por verossimilhança a melhor configuração de ocorrência de mudanças em taxas (Rabosky, 2014).

RESULTADOS

A filogenia estimada por análise bayesiana apresenta suporte alto ($p > 0,95$) para a maioria dos nós (Fig. 3.1). As exceções são a posição de *Micrablepharus*,

e a posição e relações internas em *Gymnophthalmus*. As tribos *Gymnophthalmini*, *Iphisini* e *Heterodactylini* foram bem suportadas, e *Iphisini* foi recuperado como irmão de *Heterodactylini*, corroborando resultados em Goicoechea et al., (2016), com divergência similar à divergência basal em *Gymnophthalmini* (Fig. 3.1), desta forma, *Heterodactylini* foi considerado nas análises comparativas como o clado que contém *Iphisini* e *Heterodactylini* senso estrito. O gráfico de linhagem por tempo (LTT) demonstra que o padrão de diversificação de *Gymnophthalmini* e *Heterodactylini* são semelhantes, e aproximadamente lineares (Fig. 3.2). No entanto, o melhor modelo selecionado para o padrão de diversificação em *Gymnophthalminae* (Tabela 3.3) foi de taxa variável: “*Yule-2-rate*” (Y2R). Quando testado para cada sub-clado separadamente, os melhores modelos selecionados foram também de taxa variável: “*diversity-dependent logistic model*” (DDL) para *Gymnophthalmini* e “*Yule-2-rate*” (Y2R) para *Heterodactylini* (Tabela 3.3). Porém, para *Heterodactylini* não é possível dizer que o modelo Y2R é melhor que DDX pois o $\Delta AIC = 2.90$ (Rabosky, 2006b). A função MEDUSA estimou como melhor modelo uma mudança na taxa de diversificação no nó basal para ambas as tribos. Desta forma, não foram detectadas mudanças em taxas dentro de cada tribo, exceto entre os dois principais clados de *Gymnophthalmini*.

Tabela 3.3. Comparações entre cinco modelos de diversificação testados com base na árvore calibrada de *Gymnophthalminae* (Fig. 3.1) baseado no critério de Akaike (AICc). São apresentados o número de espécies por grupo (S), a estatística *gamma* (γ), e os valores de AIC para os modelos de diversificação testados: “especiação-pura” (PB), “especiação-extinção” (BD), modelo logístico diversidade-dependente (DDL), modelo exponencial diversidade-dependente (DDX) e o modelo *Yule-2-rate* bivariado (Y2R). Em negrito são destacados os valores significativos da estatística *gamma* ($p > 0,05$) e modelos de diversificação com alto suporte ($\Delta AIC > 4$).

	S	γ	modelos				
			PB	BD	DDL	DDX	Y2R
<i>Gymnophthalminae</i>	42	0,011	125,599	127,533	127,538	127,320	120,780
tribos							
<i>Gymnophthalmini</i>	23	-2,154	73,844	75,844	69,203	70,669	72,188
<i>Heterodactylini</i>	19	-1,675	62,836	64,836	60,303	63,301	59,931

No gráfico com resultados da PCA é possível observar uma separação de espécies por tamanho no eixo X e de forma no eixo Y (Fig. 3.3). O eixo Y, que

corresponde ao segundo componente principal, representa um contraste entre alongamento do tronco e tamanho dos membros posteriores (Tabela 3.2), separando mais notavelmente, as espécies com padrão de corpo lacertiforme das espécies com padrão serpentiforme (Fig. 3.3). Os padrões de disparidade morfológica mostram variações entre os dois clados. Em Heterodactylini, não diferiram das simulações por movimento browniano (BM) exceto para tamanho do corpo (Fig. 3.4). No entanto, a grande disparidade final em tamanho pode representar os efeitos de uma amostragem incompleta de linhagens de *Heterodactylus* (Harmon et al., 2003). Para Gymnophthalmini, os padrões de disparidade morfológica diferiram das simulações por BM (Fig. 3.4). Os valores abaixo da curva indicam que a disparidade em forma do corpo e tamanho ocorreram cedo na história de Gymnophthalmini, e diferenças tendem a serem encontradas entre linhagens (i.e., gêneros) mais frequentemente que dentro das linhagens (Harmon et al., 2003).

A análise BAMM selecionou como melhores modelos: duas mudanças nas taxas de evolução em forma ($f = 0,78$), e uma mudança na taxa de evolução de tamanho do corpo ($f = 0,4$) sobre a filogenia de Gymnophthalminae (Tabela 3.4). Uma mudança significativa na taxa de evolução da forma foi detectada para Gymnophthalmini, com maior probabilidade de ter ocorrido no nó ancestral ao grupo de espécies “serpentiformes” (i.e., *Calyptommatius*, *Nothobachia* e *Scriptosaura*), e probabilidade moderada em Heterodactylini, no nó basal a *Heterodactylus* (Fig. 3.5). Uma mudança na taxa de evolução de tamanho do corpo foi estimada apenas para *Heterodactylus imbricatus* (Fig. 3.5).

Tabela 3.4. Distribuições marginais do número de possíveis mudanças de taxa presentes nos dados de Gymnophthalminae. As frequências para cada dado (i.e., taxa de evolução de tamanho do corpo (CRC) e forma do corpo (PC2)) são proporcionais à probabilidade posterior de cada modelo. O melhor modelo está destacado em negrito.

# mudanças	Probabilidades posteriores	
	Taxa em tamanho (CRC)	Taxa em forma (PC2)
0	0,000	0,004
1	0,780	0,400
2	0,180	0,380
3	0,037	0,160
4	0,002	0,046
5	0,002	0,008

DISCUSSÃO

A história de diversificação em Gymnophthalminae foi estimada como apresentando variações no acúmulo de espécies ao longo do tempo em diferentes linhagens. Porém, não há sinais claros de uma radiação ou eventos destacados de especiação, uma vez que mudanças em taxas de diversificação foram estimadas apenas para nós basais da filogenia, e o número de espécie entre as tribos Gymnophthalmini e Heterodactylini são comparáveis. As estimativas de mudanças em taxa de diversificação são sensíveis ao número de terminais das filogenias utilizadas, e padrões tendem a aparecer mais claramente em comparação de níveis taxonômicos superiores (e.g., nível de família ou superior; May e Moore, 2014). Quando comparados grandes grupos de lagartos, eventos mais destacados de diversificação ocorreram mais frequentemente no início da história das linhagens (Harmon et al., 2003; Blankers et al., 2013).

As taxas de evolução fenotípica também mostraram variações ao longo do tempo, porém, em contraste com as taxas de diversificação, o padrão de disparidade diferiu entre Gymnophthalmini e Heterodactylini. Desta forma, o padrão temporal de disparidade não é congruente com a diversificação, indicando que a evolução em tamanho e forma de corpo independe dos padrões de diversificação no grupo. Os resultados indicam que a disparidade em forma do corpo e tamanho ocorreram cedo na história de Gymnophthalmini, sendo distinta, por exemplo, da disparidade observada em lagartos *Anolis*, onde uma grande convergência adaptativa produziu a evolução repetida de “ecomorfos” em diferentes linhagens (Losos, 2009; Mahler et al., 2010). Harmon et al. (2003) sugeriu que em linhagens que apresentam uma grande taxa de diversificação em períodos iniciais (“*early bursts*”) a maior disparidade morfológica tende a ser maior entre clados, do que dentro de clados. Este padrão ocorreria devido a oportunidades ecológicas, já que os grupos tendem a ocupar nichos disponíveis em períodos de alta diversificação, diminuindo as taxas com a saturação de linhagens. Este modelo é congruente com a evolução de forma de corpo em Gymnophthalmini.

Heterodactylini, no entanto, apresentou uma forma geral de corpo conservada ao longo do tempo, que é semelhante a simulações de um modelo

por movimento browniano (um modelo “neuro” de evolução; Harmon et al., 2003) exceto em pontos mais recentes da história, especialmente em *Heterodactylus*. Este padrão pode ser explicado pela menor diversidade de microhabitats utilizados quando comparado a Gymnophthalmini, ou pela manutenção de uma forma de corpo ecologicamente mais generalista (Wiens et al., 2006; Brandley et al., 2008). O mesmo pode ser dito sobre tamanho de corpo, uma vez que uma alta taxa de disparidade ocorreu apenas em *Heterodactylus*.

Portanto, os resultados obtidos neste capítulo indicam que as duas linhagens de Gymnophthalminae apresentam tempo de diversificação semelhantes, e padrões de disparidade distintos. Apesar de que as taxas de diversificação diferiram entre os grupos, é válido destacar que os métodos implementados para detectar pontos de transição entre taxas foram apenas propostos e utilizados em tempos recentes. De fato, esses métodos ainda estão sendo testados e têm recebido críticas quanto às limitações das metodologias em produzir resultados confiáveis (May e Moore, 2014; Moore et al., 2016). Em suma, a hipótese de que diferentes regimes de diversificação seriam responsáveis pelas disparidades em morfologia observada entre as tribos não é sustentada pelos dados, e sugerem o papel de oportunidades ecológicas que permitiram aos Gymnophthalmini ocuparem uma maior diversidade de ambientes e apresentarem maior variações de hábitos de vida, especialmente por formas arenícolas e fossoriais (Rodrigues, 1991; 1996; Camacho et al., 2014).

FIGURAS

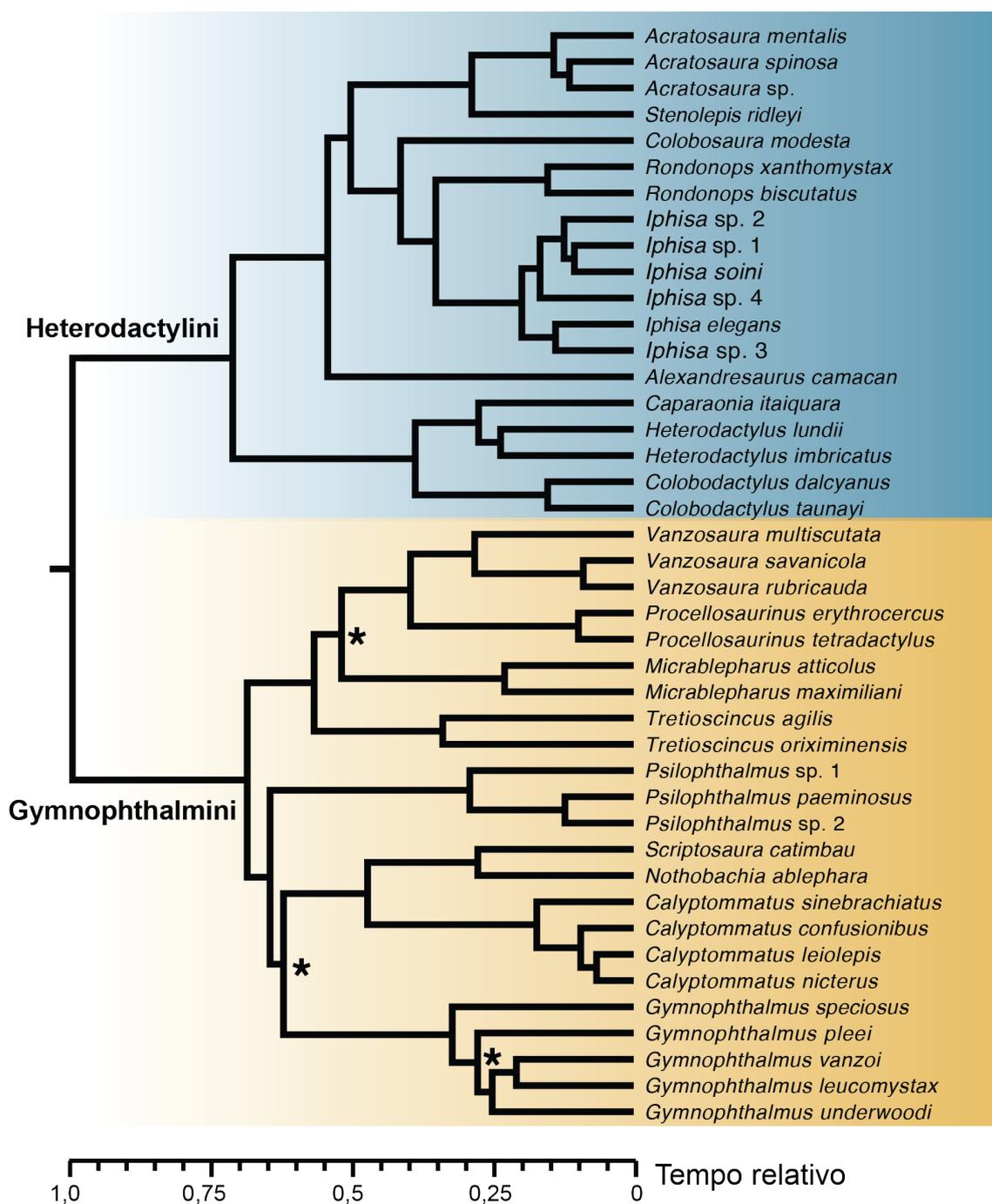


Figura 3.1. Árvore bayesiana calibrada para 42 espécies de Gymnophthalminae baseada em uma matriz concatenada com quatro genes mitocondriais e seis nucleares (6213 pb). Cores destacam os dois clados de interesse: Heterodactylini (azul) e Gymnophthalmini (amarelo). Asteriscos indicam nós com probabilidades posteriores < 0,95. Grupos-externos foram omitidos.

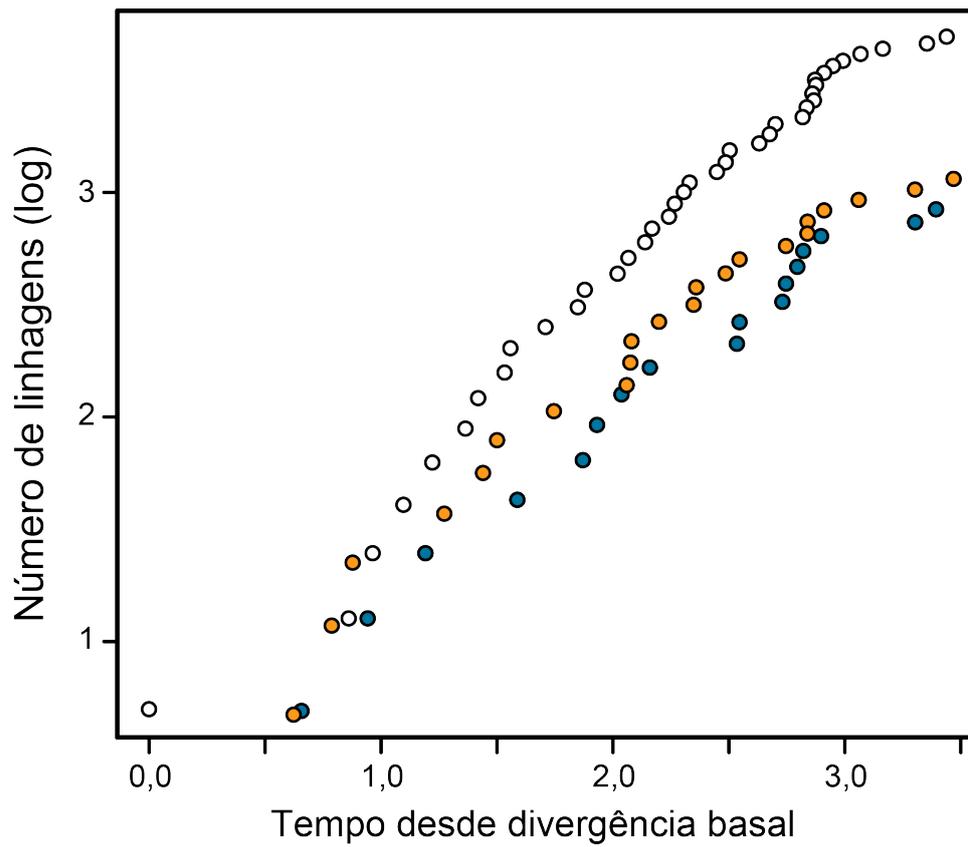


Figura 3.2. Gráfico de linhagem por tempo (LTT: *lineage-through-time plot*) para lagartos da subfamília Gymnophthalminae (círculos brancos), e individualmente para as tribos Heterodactylini (círculos azuis) e Gymnophthalmini (círculos amarelos).

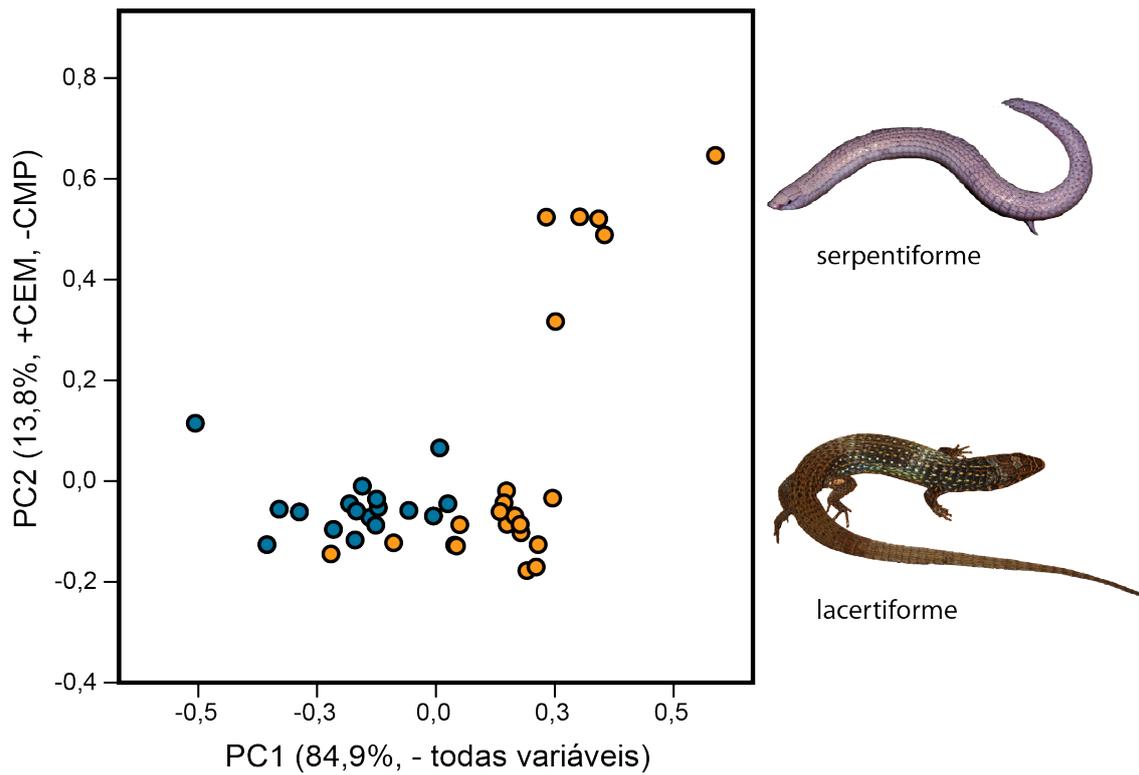


Figura 3.3. Distribuição de 40 espécies de Gymnophthalminae no espaço morfológico delimitado pelos dois primeiros componentes principais de uma PCA filogenética sobre três variáveis morfométricas (Tabela 3.2). Espécies de Heterodactylini estão representadas por círculos azuis e de Gymnophthalmini por círculos amarelos. No detalhe, uma espécie serpentiforme (*Calyptommatus leiolepis*) e uma lacertiforme (*Acratosaura spinosa*).

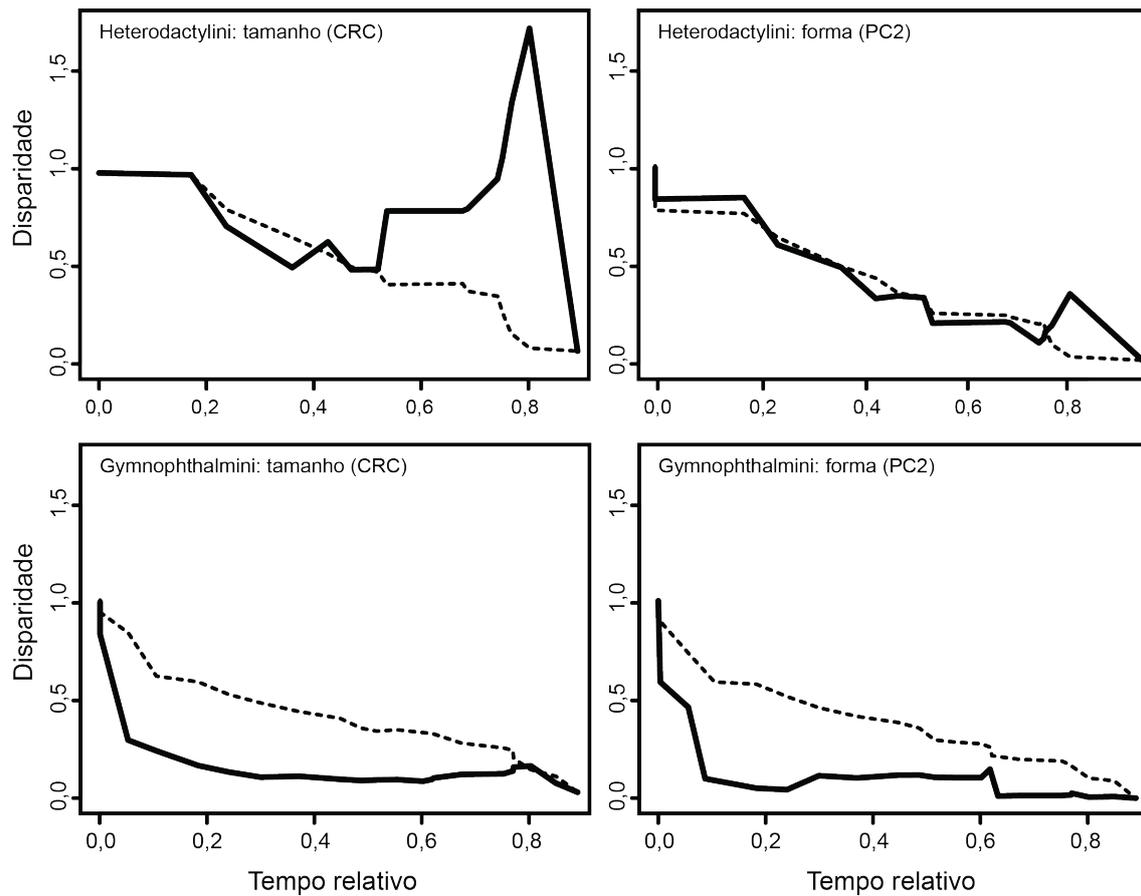


Figura 3.4. Gráficos de disparidade por tempo (DTT: *disparity-through-time plots*) para tamanho do corpo (CRC) e forma do corpo (PC2). Linhas contínuas indicam disparidade calculada com base nos dados e linhas pontilhadas disparidade estimada por 1000 simulações com base em um modelo estocástico por movimento browniano (BM).

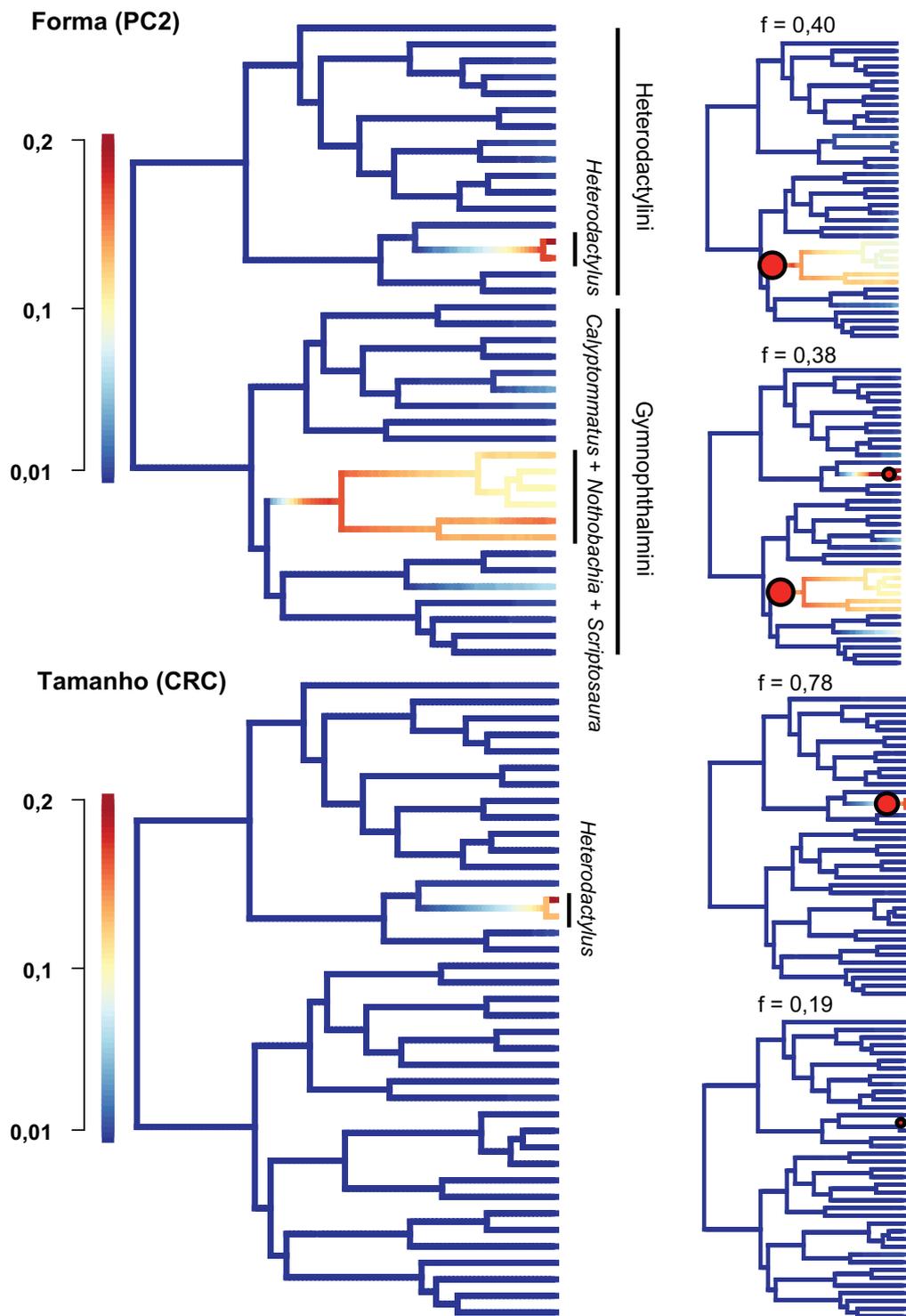


Figura 3.5. Gráficos de “filotaxas” (*phylorate plots*) destacando mudanças nas taxas de evolução em forma de corpo (acima) e tamanho (abaixo) sobre a filogenia calibrada de Gymnophthalminae. Cores ao longo dos ramos indicam taxas instantâneas de evolução fenotípica. Árvores pequenas mostram configurações alternativas com base nas probabilidades posteriores estimadas pela análise BAMM (Tabela 3.4).

CAPÍTULO 4. ESTRUTURA FILOGEOGRÁFICA E DEMOGRAFIA HISTÓRICA EM LAGARTOS DO GÊNERO *ACRATOSAURA*.

INTRODUÇÃO

A região tropical concentra a maior parte da biodiversidade mundial (Rohde, 1992). Dentre diversos fatores, têm-se atribuído a maiores taxas de diversificação nos trópicos como responsáveis pela configuração de um gradiente latitudinal de diversidade crescente das regiões subtropicais em direção aos trópicos (Rohde, 1992; Mittelbach et al., 2007; Rolland et al., 2013). No entanto, há inúmeras hipóteses sobre quais são os principais mecanismos responsáveis pela diversificação na região tropical e persistência da diversidade em tempo geológico. Com base em padrões generalizados de distribuição e diferenciação morfológica, foi enfatizado o papel do isolamento geográfico de populações (vicariância) para a especiação (Mayr, 1963; Wiley, 1988). No caso da biodiversidade neotropical, foram destacadas a presença de barreiras geológicas, em especial grandes rios amazônicos (Wallace, 1873), e a fragmentação de habitat causada por ciclos climáticos pretéritos (Haffer, 1969; Vanzolini e Williams, 1970; Prance, 1979) como principais causadores de isolamento reprodutivo e especiação em diferentes organismos.

O advento do uso de dados moleculares contribuiu enormemente para o teste de diferentes hipóteses biogeográficas por fornecer estimativas de escala de tempo para a diversificação de linhagens com base no modelo de “relógio molecular” (Kimura, 1967; Kumar, 2005), e permitir a quantificação de isolamento reprodutivo com parâmetros de genética de populações (Avise, 2000). As análises moleculares subsequentes revelaram suportes variáveis para os diferentes modelos de especiação em organismos neotropicais, e em sua maioria, revelam a predominância de diversificação pré-pleistocênica, um papel importante da heterogeneidade ambiental, e respostas dependentes de características ecológicas de linhagens a diferentes barreiras (Gascon et al., 1996; Moritz et al., 2000; Antonelli et al., 2010; Ribas et al., 2011; Rull, 2011; Fouquet et al., 2015).

No entanto, o uso de dados moleculares para o teste de hipóteses biogeográficas é escasso para organismos de áreas não florestais da região

Neotropical (Werneck, 2011). Para a região seca tropical dos desertos Australianos, abordagens filogeográficas com diferentes grupos de lagartos têm revelado um padrão regional emergente de persistência histórica e acúmulo de diversidade em áreas de relevo acentuado e diversidade empobrecida, com prevalência de espécies generalistas, em áreas da planície desértica, geologicamente mais recente (Fujita et al., 2010b; Pepper et al., 2011). À semelhança dos desertos australianos, a região das caatingas sofreu mudanças climáticas intensas ao longo do Terciário-Quaternário, caracterizada pela aridificação e consequente domínio de formações vegetais xéricas (Oliveira et al., 1999). As primeiras evidências filogeográficas para linhagens de lagartos de áreas abertas da América do Sul tropical revelaram um padrão semelhante, com persistência e diversificação de linhagens em áreas planálticas e montanhosas do Cerrado e Caatinga (Werneck et al., 2012; Domingos et al., 2014; Santos et al., 2014; Werneck et al., 2015; Guarnizo et al., 2016) e pouca diversificação com expansão recente em linhagens da depressão semiárida nordestina (Oliveira et al., 2015). No entanto, ainda faltam dados empíricos para testar os efeitos de variações demográficas e isolamento causados por mudanças paleoclimáticas para a diversificação de lagartos na região (Damasceno et al., 2014; Pinheiro et al., 2014; Werneck et al., 2015).

Acratosaura é um grupo de lagartos microteídeos (Gymnophthalmidae) com distribuição conhecida para a porção oriental da América do Sul, no contato entre Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (Centeno et al., 2014). A espécie possui pequeno tamanho de corpo, é diurna, heliófila e possui hábitos semi-fossoriais, sendo encontrada em uma variedade de habitats como campos de altitude, matas secas e caatingas-abóreas (Rodrigues et al., 2009a). Com o uso de métodos moleculares para delimitação de espécies foi demonstrado que há uma estrutura molecular profunda, que aponta a presença de quatro linhagens diferenciadas em *Acratosaura* (Capítulo 2). No entanto, há evidências de que ao menos duas destas ainda mantenham fluxo-gênico.

Neste capítulo, é utilizada uma abordagem filogeográfica com o objetivo de testar o papel de isolamento e fluxo-gênico para a especiação em *Acratosaura*. A análise é dividida em três passos: inferência do número de populações por análises de agrupamento, estimativas de variações demográficas e fluxo gênico

com modelos coalescentes, e modelagem de distribuição potencial histórica com dados paleoclimáticos.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem genética

Foram obtidas amostras de tecido de 62 indivíduos de *Acratosaura* de 23 localidades cobrindo boa parte da distribuição conhecida do gênero (Centeno et al., 2014). A extração de DNA das amostras, amplificação e sequenciamento seguiram protocolos padrões, conforme descrito no Capítulo 2. Foram obtidos fragmentos de dois genes mitocondriais: Cyt-b ($n = 62$) e ND4 ($n = 47$); e para uma sub-amostra dos indivíduos, quatro genes nucleares: PRLR ($n = 30$), RAG1 ($n = 37$), NTF3 ($n = 41$) e DNAH3 ($n = 36$), cujos *primers* e condições de amplificação estão descritos nos Capítulos 2 e 3 (Cyt-b). As sequências obtidas foram editadas e alinhadas preliminarmente utilizando GENEIOUS 6.1 (Kearse et al., 2012). Os alinhamentos finais foram feitos em CLUSTALW 2.1 (Larkin et al., 2007), com parâmetros padrões. A fase gamética dos heterozigotos foi resolvida com PHASE implementado em DNASP 5.1 (Librado & Rozas, 2009). Estatísticas sumárias foram calculadas com DNASP 5.1 (Tabela 4.1): número de sítios segregantes (S), número de haplótipos (H), diversidade haplotípica (Hd), diversidade nucleotídica (π) e número médio de substituições entre sequências (k).

Estrutura populacional

O programa STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al., 2000) foi utilizado para inferir o número de agrupamentos genéticos utilizando dois conjuntos de dados: um com os quatro *loci* nucleares, e um com cinco *loci* nucleares e o *locus* mitocondrial ND4 combinados. Foi implementado o modelo de “linkage” que permite o uso fracionado do genótipo e, portanto, considera os sítios polimórficos como *loci* nas análises (Falush et al., 2003). Foram utilizados os dois alelos dos cinco marcadores faseados de 30 indivíduos. Cada corrida do modelo consistiu de 10.000 iterações de *burn-in* seguido de 40.000 iterações de amostragem. Foram utilizados números de populações estimadas (k) de 1 a 10 e para cada k , foram realizadas 10 réplicas. Os resultados foram sumarizados em STRUCTURE HARVESTER (Earl e vonHoldt, 2012), e o $\Delta L(k)$ calculado, para a seleção do melhor k (Evanno et al., 2005)

Uma árvore filogenética bayesiana foi inferida com o programa MRBAYES 3.1 (Huelsenbeck & Ronquist 2003) utilizando os genes mitocondriais Cyt-b (710 pb) e ND4 (780 pb). O melhor modelo de substituição de nucleotídeos selecionado por JMODELTEST 2.1.6 (Darriba et al., 2012), foi GTR+I+G para ambos os *loci*. Quatro espécies foram utilizadas como grupos externos: *Alexandresaurus camacan*, *Colobosaura modesta*, *Iphisa elegans* e *Stenolepis ridleyi*. Distâncias genéticas médias entre as populações de *Acratosaura* definidas por SSTRUCTURE foram calculadas com MEGA 7 (Kumar et al., 2016). Redes de haplótipos foram estimadas por parcimônia estatística com o método TCS (Clement et al., 2000) usando POPART 1.7 (Leigh & Bryant 2015) para os alelos resolvidos dos quatro genes nucleares.

Demografia histórica

Os índices D de Tajima (Tajima, 1989), F_s de Fu (Fu, 1997) e R_2 de Ramos-Oncins e Rozas (Ramos-Oncins e Rozas, 2002), que assumem neutralidade e equilíbrio populacional, foram calculados para as populações estimadas de *Acratosaura* com o programa DNASP 5.1 e usados para explorar possíveis cenários de mudanças demográficas. Os testes de significância foram determinados com base em 10.000 simulações coalescentes, considerando ausência de recombinação, valor de θ observado, e probabilidades $p < 0,05$ para D e R_2 ; e $p < 0,02$ para F_s . Variações nos tamanhos populacionais foram reconstruídas com o método bayesiano *Extended Bayesian Skyline Plots* (EBSP; Heled e Drummond, 2008) implementado em BEAST 1.8 (Drummond et al., 2012). O método utiliza um modelo não-paramétrico que utiliza os padrões de coalescência de diferentes genealogias para inferir mudanças no tamanho efetivo populacional (N_e) ao longo do tempo (Ho e Shapiro, 2011). Foram utilizados os alinhamentos individuais do gene mitocondrial ND4 e dos quatro *loci* nucleares com haplótipos resolvidos para cada população. O melhor modelo de substituição selecionado com JMODELTEST 2.1.6 utilizando o critério AIC foi GTR+I+G para ND4 e HKY+I para os quatro *loci* nucleares. Foi utilizado um modelo de relógio molecular estrito, com taxa de substituição fixada em ND4, de $6,5 * 10^{-3}$, baseada em uma taxa estimada de 0,65% por linhagem por milhão de anos para marcadores de mtDNA codificante em Macey et al., (1999). O modelo foi corrido por 10^8 gerações, amostrado a cada 10.000 e 10% das amostras descartadas pelo *burn-in*. A convergência dos parâmetros, estacionaridade,

tamanhos efetivos populacionais altos ($ESS > 200$) e números de mudanças demográficas foram inspecionados em TRACER 1.6 (Rambaut et al., 2014).

Divergência com fluxo gênico

Para testar a possibilidade de ocorrência de fluxo gênico entre linhagens de *Acratosaura* após diferenciação, foi implementado um modelo coalescente de “isolamento com migração” (*Isolation-with-Migration*; Hey e Nielsen, 2007), com o programa IMA2 (Hey, 2010). O método foi utilizado para estimar fluxo gênico entre populações (migração), tamanho efetivo populacional atual e ancestral, e tempo de divergência basal. Foram utilizados alinhamentos dos marcadores mitocondriais Cyt-B e ND4 e dos haplótipos nucleares de DNAH3, PRLR e RAG-1, divididos em dois conjuntos de dados, um contendo três populações, *A. mentalis*, (pop.1), *A. sp. 1* (pop.2) e *A. spinosa* (pop.3), e outro contendo duas populações, *A. sp. 1* (pop.2) e *A. sp. 2* (apenas pop. 5; ver resultados). A análise foi particionada para simplificar as comparações, e evitar um modelo de cinco populações completo, que possui um número muito grande de parâmetros estimados e requer longo tempo de computação. A divisão também visa focar em comparar apenas linhagens geograficamente próximas. A taxa de mutação foi estimada em 6.5×10^{-9} mudanças por *locus* por ano, para os marcadores mitocondriais com base na taxa de mutação 0,65% por linhagem por milhão de anos de Macey et al., (1999) para genes mitocondriais. As taxas para genes nucleares foram estimadas com base nos resultados de uma árvore-de-espécies (capítulo 2). Foi utilizado o modelo de substituição HKY, escalar de hereditariedade de 0.25 para mtDNA e 1.0 para nuDNA, e tempo de geração de um ano. O limite superior definido para o tamanho populacional ($q = 30.0$) foi estimado dos resultados de EBSP, e para os parâmetros populacionais tempo de divergência basal ($t = 5.0$) e migração ($m = 1.0$) estimados conforme descrito no manual de IMA2 e ajustados após corridas preliminares. Foram implementadas 40 cadeias MCMC, e com base em análises preliminares, definidas 10^5 gerações de *burnin*, e outras 10^5 gerações para amostragem.

Modelagem de paleodistribuição

Para testar a congruência entre variações demográficas históricas e variações paleoclimáticas, foram modelados mapas de distribuição potencial histórica para as linhagens com o uso de modelagem de nicho (Guisan e Thuiller, 2005) com o programa MAXENT (Phillips e Dudík, 2008). A distribuição de

Acratosaura foi definida com pontos de ocorrência compilados da literatura (Centeno et al., 2014) e obtidos de material tombado em coleções herpetológicas (Apêndice 2) totalizando 53 ocorrências com coordenadas georreferenciadas. Foram utilizadas variáveis bioclimáticas para gerar um modelo de distribuição potencial atual, e uma projeção do modelo atual foi feita sobre as mesmas variáveis bioclimáticas que simulam cenários para o último máximo glacial (LGM). Os dados ambientais consistiram de 19 camadas climáticas globais (BIO₁₋₁₉) para o período atual (1960-1999), uma camada de elevação e 19 camadas paleoclimáticas que simulam um cenário para o último máximo glacial (LGM ~ 22.000 anos a.p.), no site do WorldClim (Hijmans et al., 2005). As camadas ambientais possuem resolução mínima de 2,5' de arco (5 km por 5 km).

As variáveis foram extraídas dos pontos de ocorrência com uso de ARCGIS10 e uma análise de componentes principais (PCA) com uma matriz de correlação utilizada para explorar correlação entre variáveis ambientais, e diferenciação de nicho entre linhagens. As variáveis bioclimáticas com correlação alta ($r > 0,90$) foram retiradas, sendo retidas para as análises subseqüentes elevação e nove das 19 variáveis climáticas: BIO₁, BIO₄, BIO₇-BIO₉, BIO₁₂, BIO₁₅-BIO₁₇. Diferenças no nicho climático são significantes entre *A. mentalis* e *A. sp. 1* (MANOVA; $F = 34,70$; $p < 0,01$) e entre *A. mentalis* e *A. sp. 2* ($F = 11,92$; $p < 0,01$), porém não são significantes entre *A. sp. 1* e *A. sp. 2* ($F = 5,60$; $p > 0,05$). Desta forma, a distribuição potencial foi modelada conjuntamente para *A. sp. 1* e *A. sp. 2* a fim de maximizar os dados utilizados nas inferências. Por ser conhecida de apenas duas localidades, *A. spinosa* não foi modelada, porém está contida no espaço climático de *A. sp. 1*.

RESULTADOS

A análise SSTRUCTURE estimou como melhor modelo um arranjo com cinco populações ($k = 5$) para o conjunto de dados com mtDNA e nuDNA, e três populações ($k = 3$) para o conjunto de dados com nuDNA (Fig. 4.1). As populações estimadas com o primeiro conjunto de dados correspondem às espécies candidatas delimitadas no capítulo 2, com a diferença de que *Acratosaura sp. 2* aparece dividida em duas populações (Fig. 4.2). Indivíduos das populações geograficamente intermediárias entre *A. sp. 1* e *A. sp. 2* (i.e.;

Contendas do Sincorá, Santa Maria da Vitória e Rio de Contas), aparecem com evidências de introgressão. Quando utilizados apenas os dados nucleares, o melhor arranjo estimado pela análise corresponde às linhagens *A. mentalis*, *A. sp. 1* agrupado com *A. spinosa*, e *A. sp. 2* (Fig. 4.2). A genealogia mitocondrial apresentou uma topologia semelhante à recuperada no capítulo 2, porém o uso de dois marcadores mtDNA resultou em melhor suporte para a posição de *A. spinosa* (Fig. 4.2A). As distâncias genéticas calculadas entre os cinco clados variaram entre 6,8 e 12,3% para Cyt-b e entre 7,5 e 13,2% para ND4 (Tabela 4.1). As linhagens se mostraram alopátricas com exceção de *A. spinosa* e *A. sp. 1* que co-ocorrem em Mucugê, Bahia (Fig. 4.2C). As redes de haplótipos inferidas para os genes nucleares demonstram pouco compartilhamento de haplótipos entre *A. mentalis* e outros clados com apenas um haplótipo de RAG-1, compartilhamento entre *A. spinosa* e uma população simpátrica de *A. sp. 1* com dois haplótipos (NTF3 e PRLR), e compartilhamento de haplótipos para os quatro loci entre populações de *A. sp. 1* e *A. sp. 2*. (Fig. 4.3D).

Tabela 4.1. Distâncias genéticas médias calculadas entre as cinco populações de *Acratosaura* (número entre parênteses) com os genes mitocondriais ND4 (diagonal superior) e Cyt-b (diagonal inferior).

	<i>A. mentalis</i> (1)	<i>A. sp. 1</i> (2)	<i>A. spinosa</i> (3)	<i>A. sp. 2</i> (4)	<i>A. sp. 2</i> (5)
<i>A. mentalis</i> (1)	-	0,075	0,109	0,132	0,126
<i>A. sp. 1</i> (2)	0,068	-	0,092	0,131	0,111
<i>A. spinosa</i> (3)	0,084	0,077	-	0,125	0,131
<i>A. sp. 2</i> (4)	0,117	0,108	0,104	-	0,136
<i>A. sp. 2</i> (5)	0,123	0,118	0,106	0,101	-

Dois populações (2 e 5) apresentaram maior diversidade genética que as restantes populações (Tabela 4.2). Os valores do teste D de Tajima não foram significantes, indicando neutralidade na evolução dos marcadores (Hartl e Clark, 2007). Os valores obtidos para F_s de Fu não foram significantes, portanto, suportam um cenário de estabilidade nos efetivos populacionais de *Acratosaura* (Hartl e Clark, 2007). Os valores do teste R_2 de Ramos-Oncins e Rozas não foram significativos exceto para DNAH3 em *A. spinosa* indicando que, em geral, as populações não sofreram modificações de tamanho (Ramos-Oncins e Rozas, 2002).

Tabela 4.2. Estatísticas genéticas sumárias estimada para cada uma das cinco populações de *Acratosaura* com base em dois genes mitocondriais e quatro nucleares: número de haplótipos (H) diversidade haplotípica (Hd), diversidade nucleotídica (π), teste D de Tajima, F_s de Fu e R_2 de Ramos-Oncins e Rozas. Valores significantes dos testes ($p < 0,05$ para D e R_2 ; $p < 0,02$ para F_s) estão destacados em negrito.

Linhagem (pop.)	Locus	N	Índices de diversidade			Testes demográficos		
			H	Hd	π	D	F_s	R_2
<i>A. mentalis</i> (1)	ND4	16	16	0,948	0,0129	-0,102	0,345	0,115
	CYTB	22	18	0,959	0,0296	1,381	-0,407	0,108
	RAG1	13	5	0,677	0,0010	-0,072	0,140	0,143
	PRLR	11	5	0,818	0,0035	-0,061	0,010	0,140
	NTF3	13	4	0,403	0,0013	0,010	0,147	0,158
	DNAH3	12	7	0,504	0,0025	-0,081	0,071	0,135
<i>A. sp. 1</i> (2)	ND4	12	12	0,948	0,0215	0,798	0,346	0,120
	CYTB	15	13	0,931	0,0264	-0,147	-0,074	0,116
	RAG1	10	2	0,100	0,0001	0,015	0,340	0,185
	PRLR	8	7	0,800	0,0037	-0,082	0,104	0,154
	NTF3	12	2	0,083	0,0002	-0,046	0,008	0,123
	DNAH3	9	12	0,094	0,0141	-0,081	0,069	0,134
<i>A. spinosa</i> (3)	ND4	3	3	0,800	0,0138	1,358	0,679	0,204
	CYTB	2	2	0,667	0,0074	0,034	0,768	0,272
	RAG1	2	4	1,000	0,0014	-0,067	0,360	0,341
	PRLR	1	1	0,000	0,0000	-	-	-
	NTF3	3	1	0,000	0,0000	-	-	-
	DNAH3	2	2	0,500	0,0014	0,004	0,340	0,353
<i>A. sp. 2</i> (4)	ND4	9	5	0,784	0,0110	-1,049	-0,115	0,134
	CYTB	9	3	0,523	0,0025	-0,102	0,120	0,148
	RAG1	6	1	0,000	0,0000	-	-	-
	PRLR	5	1	0,000	0,0000	-	-	-
	NTF3	6	2	0,167	0,0005	0,023	0,259	0,228
	DNAH3	6	4	0,303	0,0017	-0,040	0,175	0,185
<i>A. sp. 2</i> (5)	ND4	8	7	0,900	0,0253	0,647	0,118	0,139
	CYTB	8	7	0,900	0,0275	-0,090	0,077	0,136
	RAG1	6	5	0,848	0,0025	-0,016	0,213	0,170
	PRLR	6	6	0,818	0,0078	-0,159	0,167	0,162
	NTF3	9	5	0,719	0,0031	-0,041	0,216	0,159
	DNAH3	7	6	0,824	0,0036	-0,052	0,183	0,158

A análise bayesiana *Extended Bayesian Skyline Plot* (EBSP) estimou para as três populações analisadas de *Acratosaura* valores médios de mudanças em tamanho efetivo populacional entre 0 e 1 (Tabela 4.3), portanto não foi possível refutar a hipótese de tamanhos populacionais efetivos (N_e) constantes ao longo do tempo relativo das linhagens. O método inferiu um padrão de estabilidade demográfica para as três populações de *Acratosaura*, sem variações estocásticas aparentes (Fig. 4.3).

Tabela 4.3. Número de mudanças em tamanho efetivo populacional para três populações de *Acratosaura* estimado pela análise *Extended Bayesian Skyline Plot* (EBSP).

Linhagem	População	Média	Mediana	Erro da média	Desvio padrão	IC 95%
<i>A. mentalis</i>	1	0,85	1	0,173	0,978	0-2
<i>A. sp. 1</i>	3	0,77	0	0,016	0,965	0-3
<i>A. sp. 2</i>	5	0,78	1	0,107	0,959	0-3

A análise IMA2 estimou taxas de migração baixas entre as populações de *Acratosaura* (Tabela 4.4). Porém, foi estimada migração significativa de *A. spinosa* para *A. sp. 1* (0,109) no modelo 1 e de *A. sp. 1* para *A. sp. 2* (0,043) no modelo 2 (Fig. 4.4). Taxas altas, mas não significantes, foram observadas entre *A. mentalis* e a população ancestral de *A. spinosa* e *A. sp. 1*. (Tabela 4.4).

Tabela 4.4. Valores dos parâmetros tamanho populacional (θ), tempo de divergência (τ) e taxa de migração (m) atuais e ancestrais estimados por IMA2 para dois conjuntos de populações de *Acratosaura* e seus intervalos de confiança de 95%. Valores significantes de m com base no *likelihood ratio test* (Nielsen e Wakeley, 2001) estão destacados em negrito.

Parâmetro	Média	95% IC inferior	95% IC superior
modelo 1 (<i>A. mentalis</i> x <i>A. spinosa</i> x <i>A. sp. 1</i>)			
θ_0	5,416	3,345	7,605
θ_1	7,878	4,665	11,51
θ_2	3,153	0,825	6,345
θ_3	16,953	3,615	29,98
θ_4	15,208	5,535	27,14
τ_0	2,831	1,706	3,89
τ_1	3,453	2,626	3,998
$m_{0>1}$	0,033	0,0005	0,1005
$m_{1>0}$	0,031	0,0005	0,0925
$m_{0>2}$	0,028	0,0005	0,0865
$m_{2>0}$	0,087	0,0025	0,2635
$m_{1>2}$	0,059	0,0035	0,1516
$m_{2>1}$	0,109	0,0025	0,3435
$m_{0>3}$	0,479	0,0210	0,9435
$m_{3>0}$	0,483	0,0215	0,9455
modelo 2 (<i>A. sp. 1</i> x <i>A. sp. 2</i>)			
θ_0	9,869	5,882	13,434
θ_1	9,869	5,742	14,418
θ_2	14,26	8,290	20,0
τ_0	3,317	2,162	3,998
$m_{0>1}$	0,025	0	0,045
$m_{1>0}$	0,048	0	0,115

A modelagem de distribuição de *A. mentalis* (pop. 1) para o presente mostra que a sua distribuição coincide com a área de maior adequabilidade climática, exceto para uma região potencial ao sul onde não há registros (Fig. 4.5). A distribuição potencial projetada para o último máximo glacial (LGM) não difere grandemente da atual, exceto por uma pequena área na região do Piauí, e uma extensa área na porção costeira, que corresponde à plataforma continental exposta no período. A modelagem de distribuição de *Acratosaura* sp. (*A. sp.* 1 e *A. sp.* 2; populações 2, 4 e 5) apresenta uma área de adequabilidade climática mais estreita, sendo pouco coincidente pra populações mais periféricas (Fig. 4.5). Uma pequena área potencial não ocupada ocorre na região mais setentrional da Caatinga, na Chapada do Araripe e porções do planalto de Borborema, na região de ocorrência de *A. mentalis*. A distribuição potencial de *A. sp.* no LGM, no entanto, é estimada como uma área mais extensa que a atual, especialmente na porção sul (Cerrado) e na porção central da Caatinga.

DISCUSSÃO

As análises deste capítulo confirmam a presença de uma estrutura genética profunda em *Acratosaura*, mas que não é homoganeamente distribuída ao longo de sua distribuição. Uma parte significativa da diversidade genética ocorre na porção central da distribuição do gênero, na região da Chapada Diamantina, onde há simpatria entre *A. spinosa* e *A. sp.* e uma zona de contato entre dois clados de *A. sp.* com compartilhamento de haplótipos entre diferentes linhagens. Por possuir um gradiente altitudinal destacado, diversidade de ambientes, e relativa estabilidade climática histórica quanto comparado ao resto da Caatinga (Carnaval e Moritz, 2008; Pinheiro et al., 2014), a Chapada Diamantina abriga espécies com distintos requisitos ecológicos e representa uma área de endemismo importante para répteis da Caatinga com grande riqueza regional (Rodrigues et al., 2009a,b; Freitas et al., 2012). As linhagens aparentemente compartilham o tipo de habitat utilizado na região, tendo sido observados exclusivamente em campos de altitude (Rodrigues et al., 2009a; Magalhães et al., 2015). Porém, como as amostras para a região são raras, pouco se pode dizer sobre características ecológicas mais específicas que possam explicar o contato geográfico e a simpatria entre as linhagens.

As evidências demográficas genéticas e de modelagem paleoclimática indicam que *Acratosaura* manteve a distribuição e tamanho populacional relativamente estáveis ao longo do tempo tanto em regiões planálticas quanto na depressão nordestina. As áreas de contato entre linhagens mantiveram climaticamente adequadas para as linhagens, o que pode ter favorecido fluxo gênico. A aridez atual parece não restringir sua ocorrência ao longo da Caatinga, uma vez que *Acratosaura* é capaz de ocupar manchas de habitats menos expostos à insolação, em especial associada a áreas de relevo acidentado, ou de caatingas arbóreas (Rodrigues, 2003). Desta forma, o padrão de diversificação da espécie parece ter sofrido pouca influência de oscilações climáticas do Pleistoceno. O padrão apresentado, de persistência histórica e diferenciação em regiões de relevos mais elevados, é congruente com outros grupos de lagartos da região como *Phyllopezus* (Werneck et al., 2012) e *Tropidurus* (Werneck et al., 2015).

Apesar do compartilhamento de haplótipos ser aparentemente restrito a uma parte central da distribuição do gênero, a presença de fluxo gênico entre linhagens diferenciadas de *Acratosaura*, estimada pelas análises coalescentes, sugere que *Acratosaura* pode ter sofrido especiação sem isolamento reprodutivo completo. Apesar de especiação com fluxo gênico ter sido demonstrado para os lagartos *Ameivula* na região da Caatinga (Oliveira et al., 2014), a observação para *Acratosaura* é notável tendo em consideração o pequeno tamanho e hábitos crípticos. Desta forma, os resultados deste capítulo reforçam a ideia de que fluxo gênico é pervasivo em diversos grupos de organismos (Nosil, 2008; Arnold, 2015) e demonstram a importância de se considerar fluxo gênico para compreender padrões de diferenciação mesmo em grupos com capacidade limitada de dispersão.

FIGURAS

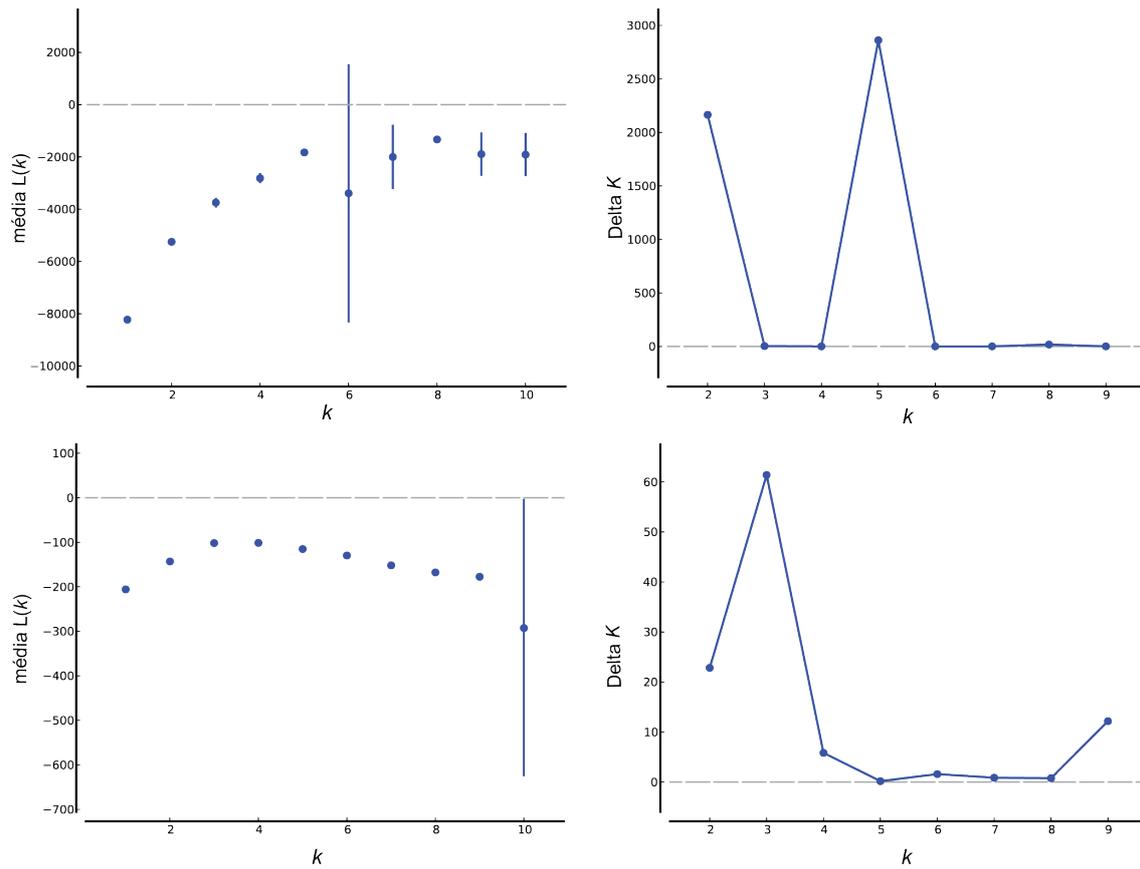


Figura 4.1. Resultados dos agrupamentos inferidos com STRUCTURE para um conjunto de dados com mtDNA + nuDNA (acima) e nuDNA (abaixo). À esquerda é mostrada a distribuição dos valores médios e desvios das estimativas de probabilidade $L(k)$ para cada população; à direita, o valor calculado de $\Delta L(k)$ conforme Evano et al. (2007).

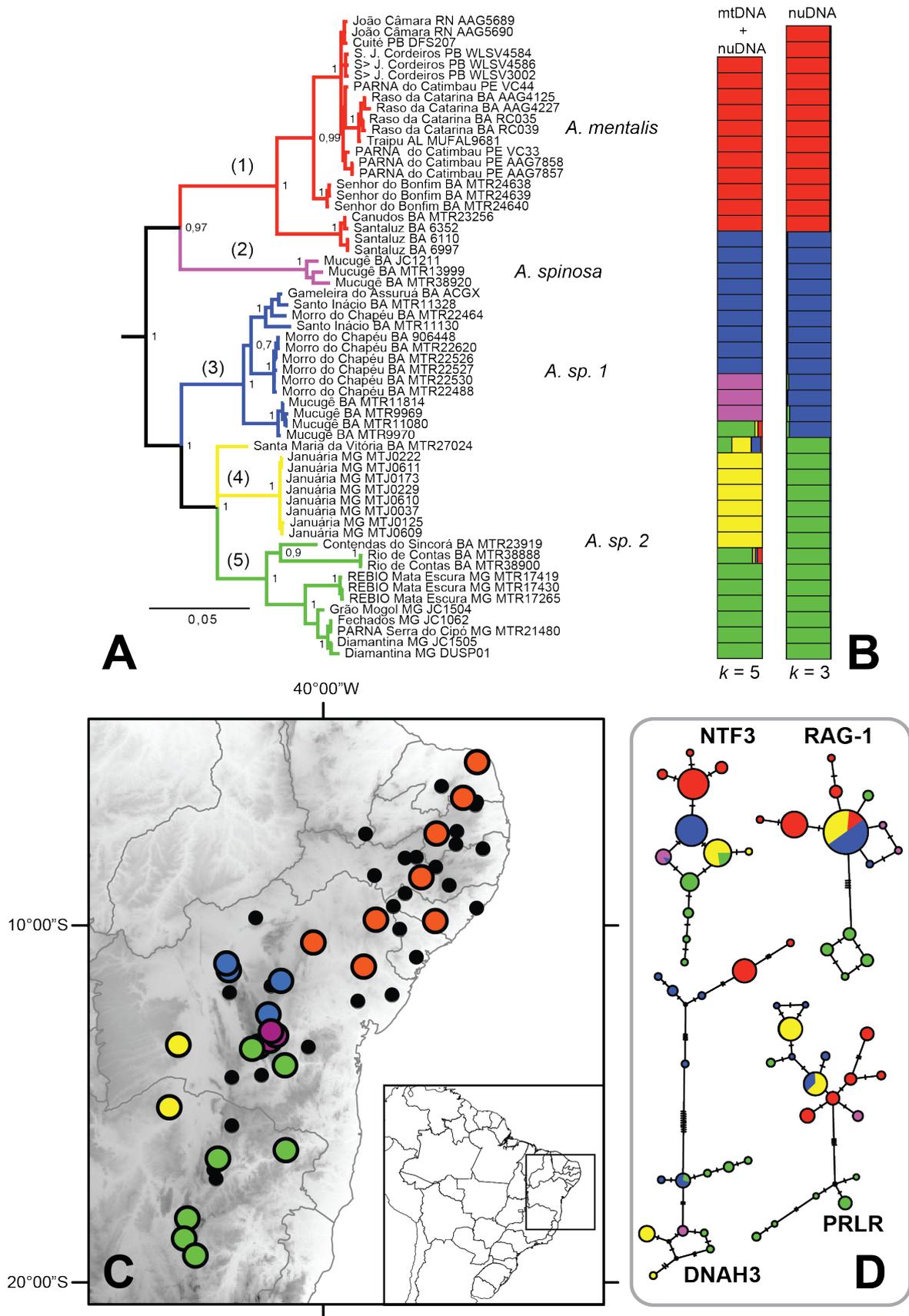


Figura 4.2. Estrutura populacional em *Acratosaura*. (A) Genealogia bayesiana mitocondrial (Cyt-b e ND4) para 62 amostras de *Acratosaura*. São indicadas as quatro

(Fig4.2. **continuação**) espécies candidatas delimitadas no capítulo 2, e as cinco populações estimadas por STRUCTURE (entre parênteses). Suportes são indicados por probabilidades posteriores, grupos externos foram omitidos. (B) Resultados da análise STRUCTURE indicando cinco populações ($k = 5$) para mtDNA + nuDNA e três ($k = 3$) para nuDNA apenas. (C) Mapa mostrando a distribuição geográfica de *Acratosaura*. Círculos grandes representam as localidades amostradas e cores correspondem aos clados da genealogia mtDNA; círculos pretos representam ocorrências sem amostra de DNA. (D) Rede de haplótipos estimadas por parcimônia estatística para quatro *loci* nucleares. Círculos representam os haplótipos, com tamanho proporcional a sua frequência; marcos nas linhas representam mutações; cores correspondem aos clados da genealogia mtDNA.

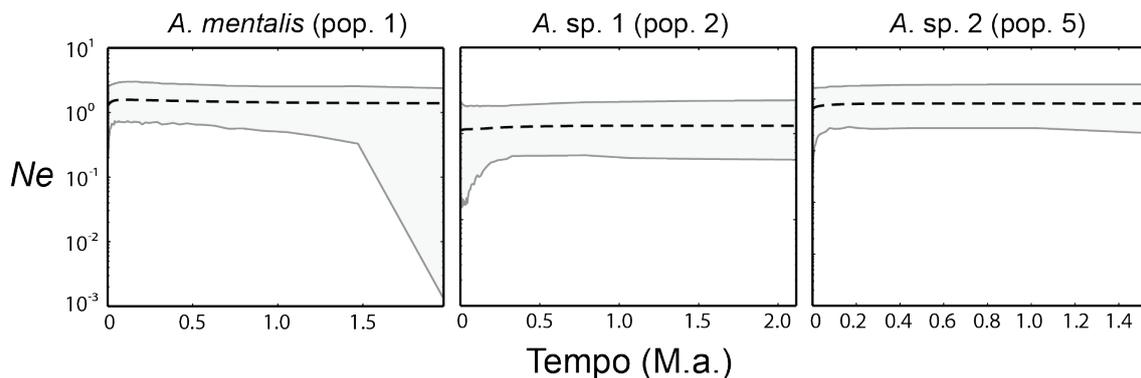


Figura 4.3. Resultados do método coalescente *Extended Bayesian Skyline Plot* (EBSP) mostrando a variação do tamanho populacional estimado (N_e) em função do tempo relativo (milhões de anos antes do presente) para três populações de *Acratosaura*. O tamanho populacional está reescalado para o tempo de geração em anos. O intervalo de confiança de 95% é demarcado por linhas cinzas contínuas.

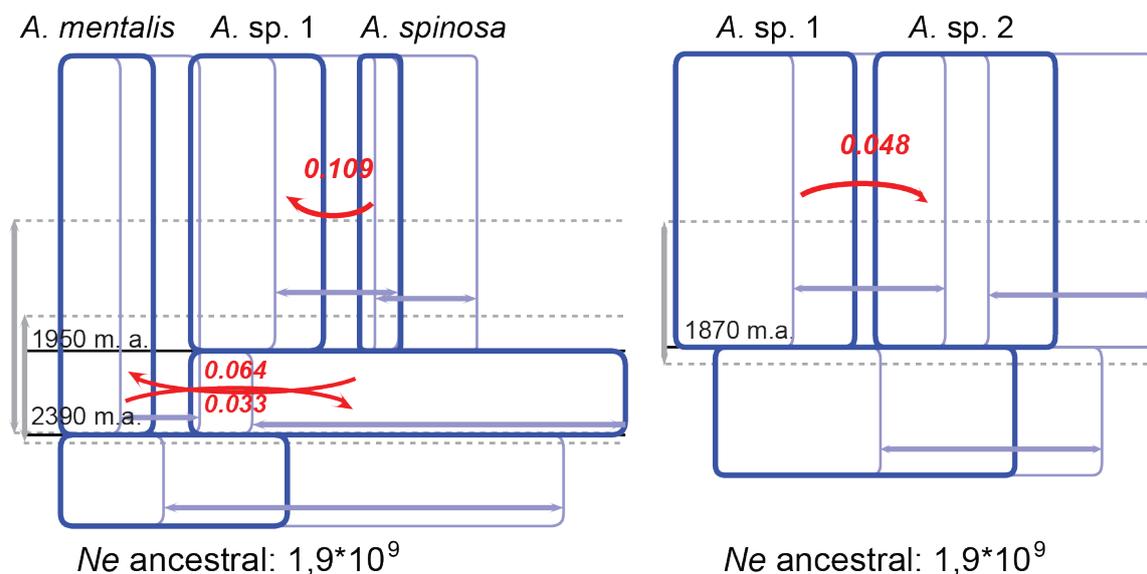


Figura 4.4. Resultados do método coalescente IMA2 mostrando os eventos de migração estimados entre as populações de *Acratosaura*. A largura dos ramos é proporcional ao tamanho efetivo (N_e); a altura proporcional ao tempo de divergência. Linhas finas e setas cinzas indicam intervalo de confiança dos parâmetros.

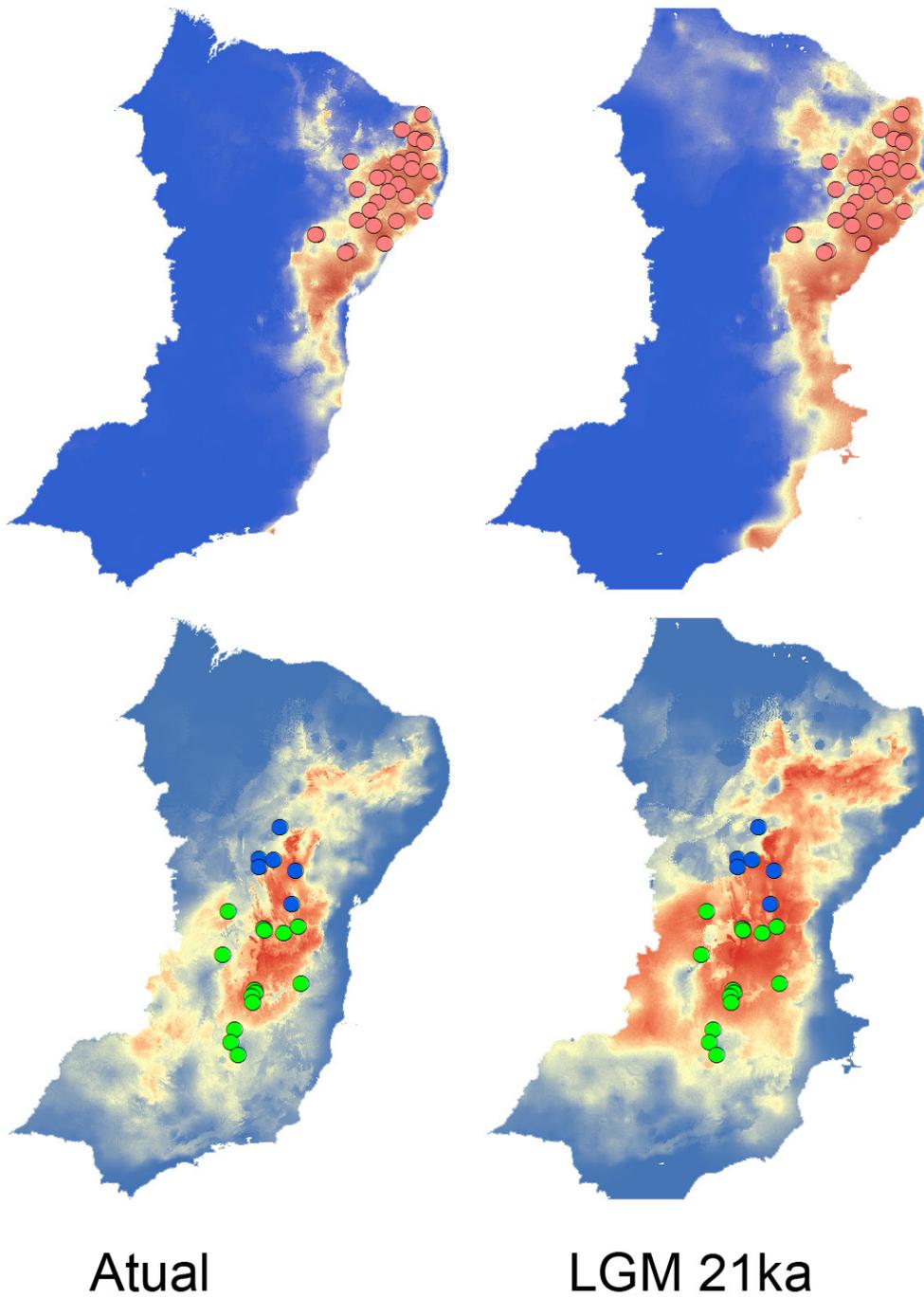


Figura 4.5. Distribuição potencial modelada para o período atual (esquerda) e para o máximo glacial (LGM; direita). Modelos foram gerados para *A. mentalis* (acima) e *Acratosaura* sp. (*A. sp. 1* + *A. sp. 2*; abaixo). Cores dos pontos de ocorrência correspondem às linhagens: *A. mentalis* (vermelho), *A. sp. 1* (azul) e *A. sp. 2* (verde). Cores quentes no mapa indicam maior adequabilidade e cores frias, menor adequabilidade.

CONCLUSÕES

Neste estudo utilizei uma série de métodos quantitativos para a delimitação de espécies em Iphisini, que exemplificam os desafios enfrentados para a inferência de arranjos taxonômicos para grupos onde a variação fenotípica é pouco evidente, e onde há incongruência entre variação em caracteres morfológicos e moleculares, ou discordância entre genealogias. Como era esperado pela pergunta inicial, há diversidade dentro da tribo Iphisini não detectada em estudos anteriores. Atualmente há oito espécies já descritas, e reconhecidas quatro espécies candidatas para *Iphisa*. Com este trabalho, mais quatro espécies são consideradas candidatas, aumentando em 33% a diversidade conhecida no grupo. A diversidade se mostrou heterogênea entre os clados de Iphisini, o que atesta pelo caráter monotípico de alguns gêneros, que apresentaram pouca estrutura genética e diferenciação. A descrição formal das espécies candidatas, ainda depende de uma análise mais profunda de caracteres morfológicos qualitativos.

As relações filogenéticas inferidas em nível de subfamília são consistentes com resultados recentemente publicados, utilizando métodos distintos para a reconstrução de árvores. Como resultado mais interessante, é a relação bem suportada como grupos-irmãos entre Iphisini e Heterodactylini. Não há fósseis conhecidos de Gymnophthalmidae que possam ser usados para a calibração das árvores, então a estimativa de tempos de divergência ainda depende de uma análise conjunta com o grupo-irmão Teiidae, o que está fora do escopo deste trabalho. No entanto, é notado que, apesar de as tribos apresentarem taxas de diversificação distintas, o tempo relativo de diversificação é semelhante entre os clados de Gymnophthalminae, quando consideradas as tribos Heterodactylini e Iphisini conjuntamente. Os padrões de disparidade morfológica também se mostraram variáveis entre as tribos, e incongruentes com tempo de diversificação para Heterodactylini (*sensu lato*). Desta forma não é possível afirmar que as diferenças morfológicas observadas entre os clados de Gymnophthalminae sejam causadas apenas por tempo ou modo de diversificação distintos. O papel de diferentes oportunidades ecológicas, ou inércia filogenética, são fatores que devem ser investigados.

Do ponto de vista populacional, *Acratosaura* mostrou estabilidade demográfica histórica e pouca variação em distribuição nos últimos 21.000 anos. Desta forma, a hipótese de que mudanças paleoclimáticas do Quaternário poderiam ter causado isolamento e diversificação em Iphisini não encontra suporte nos resultados. A presença de fluxo gênico entre linhagens já diferenciadas indica que a diversificação no grupo pode ocorrer sem isolamento reprodutivo completo. Com base na estruturação genética profunda e espacialmente complexa, é possível supor que a heterogeneidade ambiental da Chapada Diamantina deve ter contribuído para a especiação em *Acratosaura*.

REFERÊNCIAS

- Agapow, P. M., Bininda-Emonds, O. R., Crandall, K. A., Gittleman, J. L., Mace, G. M., Marshall, J. C., Purvis, A. 2004. The impact of species concept on biodiversity studies. **The quarterly review of biology**, 2004: 161-79.
- Alfaro, M. E., F. Santini, C. Brock, H. Alamillo, A. Dornburg, D. L. Rabosky, G. Carnevale, Harmon, L. J. 2009. Nine exceptional radiations plus high turnover explain species diversity in jawed vertebrates. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 106: 13410-13414.
- Andrade, S. P. de, Santos, D. L., Kawashita-Ribeiro, R. A., Vaz-Silva, W. 2013 New records and updated distribution map of *Iphisa elegans* Gray, 1851 (Reptilia, Gymnophthalmidae). **Herpetology Notes**, 6: 395-400.
- Amaral, A. 1933. Estudos sobre Lacertílios neotropicos. I. novos generos e especies de lagartos do Brasil. **Memórias do Instituto Butantan**, 7: 51-75.
- Antonelli, A., Quijada-Mascareñas, A., Crawford, A. J., Bates, J. M., Velazco, P. M., Wüster, W. 2010. Molecular studies and phylogeography of Amazonian tetrapods and their relation to geological and climatic models. In: (Hoorn, C.) **Amazonia, landscape and species evolution: a look into the past**. 386-404 pp.
- Arèvalo, E., Davis, S. K., Sites Jr., J. W. 1994. Mitochondrial DNA sequence divergence and phylogenetic relationships among eight chromosome races of the *Sceloporus grammicus* complex (Phrynosomatidae) in central Mexico. **Systematic Biology**, 43: 387-418.
- Arnold, M. L. 2015. **Divergence with genetic exchange**. Oxford University Press.
- Avise, J. C. 2000. **Phylogeography: the history and formation of species**. Harvard university press.
- Barley, A. J., White, J., Diesmos, A. C., Brown, R. M. 2013. The challenge of species delimitation at the extremes: diversification without morphological change in Philippine sun skinks. **Evolution**, 67: 3556-3572.
- Bauer, A. M., Parham, J. F., Brown, R. M., Stuart, B. L., Grismer, L., Papenfuss, T. J., Wagner, P. 2010. Availability of new Bayesian-delimited gecko names and the importance of character-based species descriptions. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, 278: 490-492.
- Bergsten, J., Bilton, D. T., Fujisawa, T., Elliott, M., Monaghan, M. T., Balke, M., ..., Ribera, I. 2012. The effect of geographical scale of sampling on DNA barcoding. **Systematic biology**, sys037.
- Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K., Meier, R., Winker, K., Ingram, K. K., Das I. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in ecology & evolution**, 22:148-55.
- Blankers, T., Townsend, T. M., Pepe, K., Reeder, T. W., Wiens, J. J. 2013. Contrasting global-scale evolutionary radiations: phylogeny, diversification, and morphological evolution in the major clades of iguanian lizards. **Biological Journal of the Linnean Society**, 108: 127-143.
- Blomberg, S. P., Garland, T. 2002. Tempo and mode in evolution: phylogenetic inertia, adaptation and comparative methods. **Journal of Evolutionary Biology**, 15: 899-910.
- Borges-Nojosa, D. M., & Caramaschi, U. 2003. Composição e análise comparativa da diversidade e das afinidades biogeográficas dos lagartos e anfisbenídeos (Squamata) dos brejos nordestinos. Pp. 181-236. In: Leal, I. R., da Silva, J. M. C. (Eds.). **Ecologia e conservação da Caatinga**. Editora Universitária UFPE.
- Borges-Nojosa, D. M., Caramaschi, U., Rodrigues, M. T. (2016). A new species of lizard *Placosoma* Tschudi, 1847 (Squamata: Gymnophthalmidae) from the relictual forest mountains of the State of Ceará, Brazil. **Zootaxa**, 4169: 160-170.
- Boulenger, G.A. 1887. Description of a new genus of lizards of the family Teiidae. **Proceedings of the Zoological Society of London**, 55: 640-642.

- Brandley, M. C., Huelsenbeck, J. P., Wiens, J. J. 2008. Rates and patterns in the evolution of snake-like body form in Squamate reptiles: evidence for repeated re-evolution of lost digits and long-term persistence of intermediate body forms. **Evolution**, 62: 2042-2064.
- Burnham, K. P., Anderson, D. R. 2002. **Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach**. 2a ed. Springer, New York
- Camacho, A., Pavão, R., Moreira, C. N., Pinto, A. C. B. C. F., Navas, C. A., Rodrigues, M. T. 2014. Interaction of morphology, thermal physiology and burrowing performance during the evolution of fossoriality in Gymnophthalmini lizards. **Functional Ecology**, 2015: 1-7.
- Camargo, A., Sinervo, B., Sites, Jr. J. W. 2010. Lizards as Model Organisms for linking phylogeographic and speciation studies. **Molecular Ecology**, 19: 3250-3270.
- Camargo, A., Sites Jr., J. W. 2013. Species delimitation: a decade after the renaissance. *In*: Pavlinov, I., (Ed.) **The Species Problem - Ongoing Issues**: InTech. INTECH Open Access Publisher.
- Camargo, A., Morando, M., Avila, L. J., & Sites, J. W. 2012. Species delimitation with ABC and other coalescent-based methods: a test of accuracy with simulations and an empirical example with lizards of the *Liolaemus darwini* complex (Squamata: Liolaemidae). **Evolution**, 66: 2834-2849.
- Carnaval, A. C., Moritz, C. 2008. Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. **Journal of Biogeography**, 35: 1187-1201.
- Carnaval, A. C., Hickerson, M. J., Haddad, C. F., Rodrigues, M. T., Moritz, C. 2009. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. **Science**, 323: 785-789.
- Carstens, B. C., Pelletier, T. A., Reid, N. M., Satler, J. D. 2013. How to fail at species delimitation. **Molecular Ecology**, 22: 4369-4383.
- Castresana, J. 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. **Molecular Biology and Evolution**, 17: 540-552.
- Centeno, F. C., Teixeira Jr., M., Recoder, R., Andrade, D. V., Rodrigues, M. T. 2014. Updated distribution map of *Acratosaura mentalis* (Squamata, Gymnophthalmidae) with a note on feeding ecology of the treefrog *Bokermannohyla alvarengai* (Anura, Hylidae). **Herpetology Notes**, 7: 783-786.
- Cheng, H., Sinha, A., Cruz, F. W., Wang, X., Edwards, R. L., d'Horta, F. M., Ribas, C. C., Vuille, M., Scott, L. D., Auler, A. S. 2013. Climate change patterns in Amazonia and biodiversity. **Nature Communications**, 4: 1411.
- Clement, M., Posada, D. C. K. A., Crandall, K. A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular ecology**, 9: 1657-1659.
- Colli, G. R., Hoogmoed, M. S., Cannatella, D. C., Cassimiro, J., Gomes, J. O., Ghellere, J. M., ..., Rodrigues, M. T. 2015. Description and phylogenetic relationships of a new genus and two new species of lizards from Brazilian Amazonia, with nomenclatural comments on the taxonomy of Gymnophthalmidae (Reptilia: Squamata). **Zootaxa**, 4000: 401-427.
- Cole, C. J., Dessauer, H. C., Barrowclough, G. F. 1988. Hybrid origin of a unisexual species of whiptail lizard, *Cnemidophorus neomexicanus*, in western North America: new evidence and a review. **American Museum Novitates**, 2905: 1-38.
- Cunha, O. R. da 1977. Lacertílios da Amazonia VI - Uma nova espécie de lagarto (*Colobosaura landii*) da região leste do Pará (Lacertilia, Teiidae). **Boletim do Museu Paraense Emilio Goeldi**, Zool. 86: 1-13.
- Damasceno, R., Strangas, M. L., Carnaval, A. C., Rodrigues, M. T., & Moritz, C. 2014. Revisiting the vanishing refuge model of diversification. **Frontiers in genetics**, 5.
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, 9: 772.
- Dayrat, B. 2005. Towards integrative taxonomy. **Biological journal of the Linnean society**, 85: 407-415.

- Degnan, J. H., Rosenberg, N. A. 2009. Gene tree discordance, phylogenetic inference and the multispecies coalescent. **Trends in Ecology & Evolution**, 24: 332-340.
- Dixon, J. R. 1974. Systematic review of the microteiid genus *Iphisa*. **Herpetologica**, 133-139.
- Domingos, F. M., Bosque, R. J., Cassimiro, J., Colli, G. R., Rodrigues, M. T., Santos, M. G., Beheregaray, L. B. 2014. Out of the deep: cryptic speciation in a Neotropical gecko (Squamata, Phyllodactylidae) revealed by species delimitation methods. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 80: 113-124.
- Drummond, A. J., Suchard, M. A., Xie, D., Rambaut, A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. **Molecular Biology and Evolution**, 29: 1969-1973.
- Earl, Dent A. and vonHoldt, Bridgett M. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, 4: 359-361.
- Edwards, D. L., Knowles, L. L. 2014. Species detection and individual assignment in species delimitation: can integrative data increase efficacy?. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, 281: 20132765.
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular ecology**, 14: 2611-2620.
- Falush, D., Stephens, M., & Pritchard, J. K. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. **Genetics**, 164: 1567-1587.
- Fetzner, Jr., J. W. 1999. Extracting High-Quality DNA from Shed Reptile Skins: A Simplified Method **BioTechniques**, 26: 1052-1054.
- Freire, E. M. X., Jorge, S., Ribeiro, L. B. 2012. First record of *Colobosaura modesta* (Reinhardt and Lütken, 1862) (Squamata: Gymnophthalmidae) to the Cariri region, state of Ceará, Brazil, with a map of its geographical distribution. **CheckList**, 8: 970-972.
- Fouquet A., Courtois E. A., Baudain D., Lima J. D., Souza S. M., Noonan B. P. Rodrigues M. T. 2015. The trans-riverine genetic structure of 28 Amazonian frog species is dependent on life history. **Journal of Tropical Ecology**, 31: 361-373.
- Fu, Y. X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, 147: 915-925.
- Fujisawa, T., Barraclough, T. G. 2013. Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent (GMYC) approach: a revised method and evaluation on simulated datasets. **Systematic Biology**, syt033.
- Fujita, M. K., Leaché, A. D., Burbrink, F. T., McGuire, J. A., Moritz, C. 2012. Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. **Trends in Ecology & Evolution**, 27: 480-488.
- Fujita, M. K., J. A. McGuire, S. C. Donnellan, C. Moritz. 2010. Diversification & persistence at the arid-monsoonal interface: Australia-wide biogeography of the Bynoe's gecko (*Heteronotia binoei*; Gekkonidae). **Evolution**, 64: 2293-2314
- Futuyma, D. 2009. **Evolution**. 2^a ed, Sinauer Associates Inc., Sunderland.
- Gamble, T., Colli, G. R., Rodrigues, M. T., Werneck, F. P., Simons, A. M. 2012. Phylogeny and cryptic diversity in geckos (*Phyllopezus*; Phyllodactylidae; Gekkota) from South America's open biomes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 62: 943-953.
- Garzón-Orduña, I. J., Benetti-Longhini, J. E., Brower, A. V. Z. 2014. Timing the diversification of the Amazonian biota: butterfly divergences are consistent with Pleistocene refugia. **Journal of Biogeography**, 41: 1631-1638.
- Gascon, C., Loughheed, S. C., & Bogart, J. P. 1996. Genetic and morphological variation in *Vanzolinius discodactylus*: a test of the river hypothesis of speciation. **Biotropica**, 1996: 376-387.

- Goicoechea, N., Frost, D. R., De La Riva, I., Pellegrino, K., Sites, J., Rodrigues, M. T., Padial, J. M. 2016. Molecular systematics of teioid lizards (Teioidea/Gymnophthalmoidea: Squamata) based on the analysis of 48 loci under tree-alignment and similarity-alignment. **Cladistics**, 32: 624-671.
- Gray, J. E. 1852. Description of a new genus and family of cyclosaurian lizards, from Pará. **Proceedings of the Zoological Society of London**, 19: 38-39.
- Grizante, M. B., Brandt, R., Kohlsdorf, T. 2012. Evolution of body elongation in gymnophthalmid lizards: relationships with climate. **PLoS ONE**, 7: e49772.
- Grummer, J. A., Bryson, R. W., Reeder, T. W. 2014. Species delimitation using Bayes factors: simulations and application to the *Sceloporus scalaris* species group (Squamata: Phrynosomatidae). **Systematic biology**, 63: 119-133.
- Guarnizo, C. E., Werneck, F. P., Giugliano, L. G., Santos, M. G., Fenker, J., Sousa, L., ... Dorado-Rodrigues, T. F. 2016. Cryptic lineages and diversification of an endemic anole lizard (squamata, dactyloidae) of the cerrado hotspot. **Molecular phylogenetics and evolution**, 94: 279-289.
- Guisan, A., Thuiller, W. 2005. Predicting species distribution: offering more than simple habitat models. **Ecology letters**, 8 (9): 993-1009.
- Haffer, J. 1969. Speciation in Amazonian forest birds. **Science**, 165: 131-137.
- Haffer, J. 2008. Hypotheses to explain the origin of species in Amazonia. **Brazilian Journal of Biology**, 68: 917-947.
- Harmon, L. J., Schulte, J. A., Larson, A., Losos, J. B. 2003. Tempo and mode of evolutionary radiation in iguanian lizards. **Science**, 301: 961-964.
- Hartl, D. L., Clark, A. G. 2007. **Principles of Population Genetics**. 4^aed. Sinauer Associates.
- Heled, J., Drummond, A. J. 2008. Bayesian inference of population size history from multiple loci. **BMC Evolutionary Biology**, 8: 1.
- Heled, J., Drummond, A. J. 2010. Bayesian inference of species trees from multilocus data. **Molecular Biology and Evolution**, 27: 570-580.
- Hey, J., Nielsen, R. 2007. Integration within the Felsenstein equation for improved Markov chain Monte Carlo methods in population genetics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 104:2785-2790.
- Hey, J. 2010. Isolation with migration models for more than two populations. **Molecular biology and evolution**, 27: 905-920.
- Hijmans, R. J., Cameron, S. E., Parra, J. L., Jones, P. G., Jarvis, A. 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. **International journal of climatology**, 25: 1965-1978.
- Ho, S. Y., Shapiro, B. 2011. Skylineplot methods for estimating demographic history from nucleotide sequences. **Molecular ecology resources**, 11: 423-434.
- Hoorn, C., Wesselingh, P., ter Steege, H., Bermudez, M. A., Mora, A., Sevink, J., Sanmartín, I., Sanchez-Meseguer, A., Anderson, C. L., Figueiredo, J. P., Jara-millo, C., Riff, D., Negri, F. R., Hoog-hiemstra, H., Lundberg, J., Stadler, T., Särkinen, T., Antonelli, A. 2010. Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. **Science**, 330: 927-931.
- Huelsenbeck, J. P., Ronquist, F. 2003. MrBayes 3: Bayesian inference under mixed models. **Bioinformatics**, 19: 1572-1574.
- Joly, S. 2012. JML: testing hybridization from species trees. **Molecular Ecology Resources**, 12: 179-184.
- Joly, S., McLenachan, P. A., Lockhart, P.J. 2009. A statistical approach for distinguishing hybridization and incomplete lineage sorting. **The American Naturalist**, 174: e54–e70.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P., Drummond, A. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, 28: 1647-1649. <http://www.geneious.com>.

- Kimura, M. 1984. **The neutral theory of molecular evolution**. Cambridge University Press.
- Kizirian, D. A., Cole, C. J. 1999. Origin of the Unisexual Lizard *Gymnophthalmus underwoodi* (Gymnophthalmidae) Inferred from Mitochondrial DNA Nucleotide Sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 11: 394-400.
- Knowles, L. L., Carstens, B. C. 2007. Delimiting species without monophyletic gene trees. **Systematic biology**, 56: 887-895.
- Kozak, K. H., & Wiens, J. J. 2010. Accelerated rates of climatic-niche evolution underlie rapid species diversification. **Ecology Letters**, 13: 1378-1389.
- Kuchta, S. R., Brown, A. D., Converse, P. E., & Highton, R. 2016. Multilocus Phylogeography and Species Delimitation in the Cumberland Plateau Salamander, *Plethodon kentucki*: Incongruence among Data Sets and Methods. **PLoS one**, 11: e0150022.
- Kumar, S. 2005. Molecular clocks: four decades of evolution. **Nature Reviews Genetics**, 6: 654-662.
- Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S. Y. W., Guindon, S. 2012. PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. **Molecular Biology and Evolution**, 29:1695-1701.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, 23: 2947-2948.
- Leaché, A. D., Fujita, M. K. 2010. Bayesian species delimitation in West African forest geckos (*Hemidactylus fasciatus*). **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, rspb20100662.
- Leaché AD, Fujita MK, Minin VN, Bouckaert RR, 2014. Species delimitation using genome-wide SNP Data. **Systematic Biology**, 63: 534-542.
- Leigh, J. W., Bryant, D. 2015. PopART: full-feature software for haplotype network construction. **Methods in Ecology and Evolution**, 6: 1110-1116.
- Lewinsohn, T. M., Prado, P. I. (2005). Quantas espécies há no Brasil?. **Megadiversidade**, 1: 36-42.
- Librado, P., Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, 25: 1451-1452.
- Losos, J. B. 2011. **Lizards in an evolutionary tree: ecology and adaptive radiation of Anoles**. University of California Press, Berkeley.
- Macey, J. R., Schulte, J. A., Larson, A., Tuniyev, B. S., Orlov, N., & Papenfuss, T. J. 1999. Molecular phylogenetics, tRNA evolution, and historical biogeography in anguid lizards and related taxonomic families. **Molecular phylogenetics and evolution**, 12: 250-272.
- Magalhães, F. M., Laranjeiras, D. O., Costa, T. B., Juncá, F. A., Mesquita, D. O., Röhr, D. L. Garda, A. A. 2015. Herpetofauna of protected areas in the Caatinga IV: Chapada Diamantina National Park, Bahia, Brazil. **Herpetology Notes**, 8: 243-261.
- Mahler, D. L., Revell, L. J., Glor, R. E., Losos, J. B. 2010. Ecological opportunity and the rate of morphological evolution in the diversification of Greater Antillean anoles. **Evolution**, 64: 2731-2745.
- Manly, B. F. 2004. **Multivariate statistical methods: a primer**. CRC Press.
- May, M. R., Moore, B. R. 2014. How Well Can We Detect Shifts in Rates of Lineage Diversification? A Simulation Study of Sequential AIC Methods. **Biorxiv**, 011452.
- McGuire, G., Wright, F. 2000. TOPAL 2.0: improved detection of mosaic sequences within multiple alignments. **Bioinformatics**, 16: 130-134.
- Milne, I., Lindner, D., Bayer, M., Husmeier, D., McGuire, G., Marshall, D. F., Wright, F. 2009. TOPALi v2: a rich graphical interface for evolutionary analyses of multiple alignments on HPC clusters and multi-core desktops. **Bioinformatics**, 25: 126-127.
- Miralles, A., Carranza, S. 2010. Systematics and biogeography of the Neotropical genus *Mabuya*, with special emphasis on the Amazonian skink *Mabuya nigropunctata* (Reptilia, Scincidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 54: 857-869.

- Miralles, A., Vences, M. 2013. New metrics for comparison of taxonomies reveal striking discrepancies among species delimitation methods in *Madascincus* lizards. **PLoS One**, 8: e68242.
- Mittelbach, G. G., Schemske, D. W., Cornell, H. V., Allen, A. P., Brown, J. M., Bush, M. B., Harrison, S. P., Hurlbert, A. H., Knowlton, N., Lessios, H. A., McCain, C. M., McCune, A. R., McDade, L. A., McPeck, M. A., Near, T. J., Price, T. D., Ricklefs, R. E., Roy, K., Sax, D. F., Schluter, D., Sobel, J. M., Turelli, M. 2007. Evolution and the latitudinal diversity gradient: speciation, extinction and biogeography. **Ecology letters**, 10: 315-331.
- Mittermeier, R.A.; Gil, P.R. & Mittermeier, C.G. (Eds.). 1997. **Megadiversity: earth's biologically wealthiest nations**. Cemex, Mexico.
- Monaghan, M. T., Wild, R., Elliot, M., Fujisawa, T., Balke, M., Inward, D. J., Ranaivosolo, R., Eggleton, P., Barraclough, T. G., Vogler, A. P. 2009. Accelerated species inventory on Madagascar using coalescent-based models of species delineation. **Systematic Biology**, 58: 298-311.
- Moore, B.R., Höhna, S., May, M.R., Rannala, B., Huelsenbeck, J.P. 2016. Critically evaluating the theory and performance of Bayesian analysis of macroevolutionary mixtures. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 113: 9569-9574.
- Moritz, C., Patton, J. L., Schneider, C. J., Smith, T. B. 2000. Diversification of rainforest faunas: an integrated molecular approach. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 533-563.
- Morlon, H. 2014. Phylogenetic approaches for studying diversification. **Ecology letters**, 17: 508-525.
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Da Fonseca, G. A., & Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, 403: 853-858.
- Nogueira, C. 2006. **Diversidade e padrões de distribuição da fauna de lagartos do Cerrado**. Tese (Doutorado), Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Nosil, P. 2008. Speciation with gene flow could be common. **Molecular Ecology**, 17: 2103-2106.
- Nunes, P. M. S. 2011. **Morfologia hemipeniana dos lagartos microteídeos e suas implicações nas relações filogenéticas da família Gymnophthalmidae (Teiioidea: Squamata)**. Tese (Doutorado), Universidade de São Paulo, São Paulo. 137pp.
- Nunes, P. M. S., Fouquet, A., Curcio, F. F., Kok, P. J. R., Rodrigues, M. T. 2012. Cryptic species in *Iphisa elegans* Gray, 1851 (Squamata: Gymnophthalmidae) revealed by hemipenial morphology and molecular data. **Zoological Journal of the Linnean Society**, 166: 361-376.
- Oliveira-Filho, A. T., Ratter, J. A. 2002. Vegetation Physiognomies and Woody Flora of the Cerrado Biome. Pp. 91-120. *In*: Oliveira P. S., Marquis, R. J. (eds.). **The Cerrados of Brazil**. New York, Columbia University Press.
- de Oliveira, P. E., Barreto, A. M. F., Suguio, K. 1999. Late Pleistocene/Holocene climatic and vegetational history of the Brazilian caatinga: the fossil dunes of the middle Sao Francisco River. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, 152: 319-337.
- Oliveira, E. F., Gehara, M., São-Pedro, V. A., Chen, X., Myers, E. A., Burbrink, F. T., ... Arias, F. J. 2015. Speciation with gene flow in whiptail lizards from a Neotropical xeric biome. **Molecular ecology**, 24: 5957-5975.
- Padial, J. M., Miralles, A., De la Riva, I., Vences, M. 2010. Review: The integrative future of taxonomy. **Frontiers in Zoology**, 7: 1-14.
- Palumbi S. R. 1996. Nucleic acids II: The polymerase chain reaction. *In* **Molecular Systematics**, 2nd ed., Hillis, D.M., C. Moritz, B.K. Mable (eds.) Pp. 205-247.
- Pellegrino, K. C. M., Rodrigues, M. T., Yonenaga-Yassuda, Y., Sites Jr., J. W. 2001. A molecular perspective on the evolution of microteiid lizards (Squamata, Gymnophthalmidae), and a new classification for the family. **Biological Journal of the Linnean Society**, 74: 315-338.

- Pellegrino, K. C., Rodrigues, M. T., Harris, D. J., Yonenaga-Yassuda, Y., Sites Jr., J. W. 2011. Molecular phylogeny, biogeography and insights into the origin of parthenogenesis in the Neotropical genus *Leposoma* (Squamata: Gymnophthalmidae): Ancient links between the Atlantic Forest and Amazonia. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 6: 446-459.
- Pepper, M., Ho, S. Y., Fujita, M. K., Keogh, J. S. 2011. The genetic legacy of aridification: climate cycling fostered lizard diversification in Australian montane refugia and left low-lying deserts genetically depauperate. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 61: 750-759.
- Phillips, S. J., Dudík, M. 2008. Modeling of species distributions with Maxent: new extensions and a comprehensive evaluation. **Ecography**, 31: 161-175.
- Pinheiro, F., Cozzolino, S., Draper, D., de Barros, F., Félix, L. P., Fay, M. F., Palma-Silva, C. 2014. Rock outcrop orchids reveal the genetic connectivity and diversity of inselbergs of northeastern Brazil. **BMC Evolutionary Biology**, 14: 49.
- Pons, J., Barraclough, T. G., Gomez-Zurita, J., Cardoso, A., Duran, D. P., Hazell, S., Kamoun, S., Sumlin, W. D., Vogler, A. P. 2006. Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. **Systematic Biology**, 55: 595-609.
- Posada, D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. **Molecular Biology and Evolution**, 25: 1253-1256.
- Prates, I., Xue, A. T., Brown, J. L., Alvarado-Serrano, D. F., Rodrigues, M. T., Hickerson, M. J., Carnaval, A. C. 2016. Inferring responses to climate dynamics from historical demography in neotropical forest lizards. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 113: 7978-7985.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, 155: 945-959.
- Purvis, A. 1996. Using interspecies phylogenies to test macroevolutionary hypotheses. Pp: 153-168. In: Harvey, Leigh, Maynard, Nee (Eds). **New Uses for New Phylogenies**. Oxford University Press, Oxford.
- Pyron, R. A., Burbrink, F. T. 2012. Extinction, ecological opportunity, and the origins of global snake diversity. **Evolution**, 66: 163-178.
- Pyron, R. A., Burbrink, F. T. 2013. Phylogenetic estimates of speciation and extinction rates for testing ecological and evolutionary hypotheses. **Trends in ecology & evolution**, 28: 729-736.
- R Development Core Team 2016. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. <http://www.R-project.org>.
- Rabosky, D. L. 2006a. LASER: a maximum likelihood toolkit for detecting temporal shifts in diversification rates from molecular phylogenies. **Evolutionary Bioinformatics**, 2.
- Rabosky, D. L. 2006b. Likelihood methods for detecting temporal shifts in diversification rates. **Evolution**, 60: 1152-1164.
- Rabosky, D. L. 2014. Automatic Detection of Key Innovations, Rate Shifts, and Diversity-Dependence on Phylogenetic Trees. **PLoS ONE**, 9: e89543.
- Rambaut, A., Suchard, M. A., Xie D., Drummond A. J. 2014. **Tracer v1.6**, Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- Ramos-Onsins, S. E., Rozas, J. 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. **Molecular biology and evolution**, 19: 2092-2100.
- Rannala, B. 2015. The art and science of species delimitation. **Current Zoology**, 61: 846-853.
- Recoder, R. S., Ribeiro, M. C., Rodrigues, M. T. 2013. Spatial variation in morphometry in *Vanzosaura rubricauda* (Squamata, Gymnophthalmidae) from open habitats of South America and its environmental correlates. **South American Journal of Herpetology**, 8: 186-197.

- Recoder, R. S., Werneck, F. P.; Teixeira Jr, M., Colli, G. R., Sites, J. W., Rodrigues, M. T. 2014. Geographic variation and systematic review of the lizard genus *Vanzosaura* (Squamata, Gymnophthalmidae), with the description of a new species. **Zoological Journal of the Linnean Society**, 171: 206-225.
- Reid, N. M., Carstens, B. C. 2012. Phylogenetic estimation error can decrease the accuracy of species delimitation: a Bayesian implementation of the general mixed Yule-coalescent model. **BMC Evolutionary Biology**, 12: 196.
- Reinhardt, J., C. Lütken. 1862. Bidrag til Kundskab om Brasiliens Padder og Krybdyr. Første Afdeling Paddern og Oglerne. **Vidensk. Medd. Dansk Naturhist. Foren. Kjobenhavn**, 1861: 143-242.
- Rensch, B. 1959. **Evolution above the species level**. Columbia University Press, NY.
- Revell, L. J. 2009. Size-correction and principal components for interspecific comparative studies. **Evolution**, 63: 3258-3268.
- Ribas, C. C., Aleixo, A., Nogueira, A. C., Miyaki, C. Y., Cracraft, J. 2011. A palaeobiogeographic model for biotic diversification within Amazonia over the past three million years. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, rspb20111120.
- Ricklefs, R. E. 2007. Estimating diversification rates from phylogenetic information. **Trends in Ecology & Evolution**, 22: 601-610.
- Ricklefs, R. E. 2010. Evolutionary diversification, coevolution between populations and their antagonists, and the filling of niche space. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 107: 1265-1272.
- Rodrigues, M. T. 1991a. Herpetofauna das dunas interiores do Rio São Francisco, Bahia, Brasil. I: Introdução a área e descrição de um novo gênero de Microteiideos (*Calyptommatius*) com notas sobre sua ecologia, distribuição e especiação (Sauria, teiidae). **Papéis Avulsos de Zoologia**, 3: 285-320.
- Rodrigues, M. T. 1991b. Herpetofauna das dunas interiores do Rio São Francisco, Bahia, Brazil. II. *Psilophthalmus*: um novo gênero de microteiideos sem pálpebra (Sauria, Teiidae). **Papéis Avulsos de Zoologia**, São Paulo, 37: 321-327.
- Rodrigues, M. T. 1996. Lizards, snakes, and amphisbaenians from the quaternary sand dunes of the middle Rio São Francisco, Bahia, Brazil. **Journal of Herpetology**, 513-523.
- Rodrigues, M. T. 2003. Herpetofauna da caatinga. In: **Ecologia e conservação da Caatinga** (Leal, I. R., & da Silva, J. M. C.) 181-236pp. Editora Universitária UFPE.
- Rodrigues, M. T. 2005. A biodiversidade dos Cerrados: conhecimento atual e perspectivas, com uma hipótese sobre o papel das matas galerias na troca faunística durante ciclos climáticos. In: Scariot, A., Silva, J. C. S., Felfili, J. M. (Ed.). **Cerrado: Ecologia, biodiversidade e conservação**, Brasília, 439 Pp.
- Rodrigues, M. T., Borges, D. M. 1997. A new species of Leposoma (Squamata: Gymnophthalmidae) from a relictual forest in semiarid northeastern Brazil. **Herpetologica**, 1-6.
- Rodrigues, M. T., Santos, E. M. 2008. A new genus and species of eyelid-less and limb reduced gymnophthalmid lizard from northeastern Brazil (Squamata, Gymnophthalmidae). **Zootaxa**, 1873: 50-60.
- Rodrigues, M. T., Pellegrino, K. C. M., Dixo M, Verdade, V. K., Pavan, D., Argolo, A. J. S., Sites Jr., J. W. 2007. A New Genus of Microteiid Lizard from the Atlantic Forests of State of Bahia, Brazil, with a New Generic Name for *Colobosaura mentalis*, and a Discussion of Relationships Among the Heterodactylini (Squamata, Gymnophthalmidae). **American Museum Novitates**, 3565: 1-27.
- Rodrigues, M. T., Cassimiro, J., Freitas, M. A., Silva, T. F. S. 2009a. A new microteiid lizard of the genus *Acratosaura* (Squamata: Gymnophthalmidae) from Serra do Sincorá, State of Bahia, Brazil. **Zootaxa**, 2013: 17-19.
- Rodrigues, M. T., Freitas, M. A., Silva, T. F. S. 2009b. New Species of Earless Lizard genus *Heterodactylus* (Squamata: Gymnophthalmidae) from the Highlands of Chapada Diamantina, State of Bahia, Brazil. **Journal of Herpetology**, 43: 605-611.

- Rodrigues, M. T., Cassimiro, J., Pavan, D., Curcio, F. F., Verdade, V. K., Pellegrino, K. C. M. 2009c. A New Genus of Microteiid Lizard from the Caparaó Mountains, Southeastern Brazil, with a Discussion of Relationships among Gymnophthalminae (Squamata). **American Museum Novitates**, 3673: 1-27.
- Rohde, K. 1992. Latitudinal gradients in species diversity: the search for the primary cause. **Oikos**, 65: 514-527.
- Rolland, J., Condamine, F. L., Jiguet, F., Morlon, H. 2014. Faster Speciation and Reduced Extinction in the Tropics Contribute to the Mammalian Latitudinal Diversity Gradient. **PLoS Biology**, 12: e1001775.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A., Huelsenbeck, J. P. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic biology**, 61: 539-542.
- Roscito, J. G., Rodrigues, M. T. 2012. Embryonic development of the fossorial gymnophthalmid lizards *Nothobachia ablephara* and *Calyptommatus sinebrachiatus*. **Zoology**, 115: 302-318.
- Rosenblum, E. B. 2006. Convergent evolution and divergent selection: lizards at the White Sands ecotone. **The American Naturalist**, 167:1-15.
- Rull, V. 2011. Neotropical biodiversity: timing and potential drivers. **Trends in Ecology and Evolution**, 26: 508-513.
- Saint, K. M., Austin, C. C., Donnellan, S. C., Hutchinson, M. N. 1998. C-mos, a nuclear marker useful for squamate phylogenetic analysis. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 10: 259-263.
- Santos, M. G., Nogueira, C., Giugliano, L. G., Colli, G. R. 2014. Landscape evolution and phylogeography of *Micrablepharus atticolus* (Squamata, Gymnophthalmidae), an endemic lizard of the Brazilian Cerrado. **Journal of Biogeography**, 41: 1506-1519.
- Siedschlag, A. C., Benozzati M. L., Passoni J. C., Rodrigues, M. T. 2010 Genetic structure, phylogeny, and biogeography of Brazilian eyelid-less lizards of genera *Calyptommatus* and *Nothobachia* (Squamata, Gymnophthalmidae) as inferred from mitochondrial DNA sequences. **Molecular phylogenetics and evolution**, 56: 622-630.
- Simpson, G. G. 1944. **Tempo and mode in evolution**. Columbia University Press, New York.
- Sites, J. W., Marshall, J. C. 2003. Delimiting species: a renaissance issue in systematic biology. **Trends in Ecology and Evolution**, 18: 462-470.
- Smith, B. T., McCormack, J. E., Cuervo, A. M., Hickerson, M. J., Aleixo, A., Cadena, C. D., Pérez-Emán, J., Burney, C. W., Xie, X., Harvey, M. G., Faircloth, B. C., Glenn, T. C., Derryberry, E. P., Prejean, J., Fields, S., Brumfield, R. T. 2014. The drivers of tropical speciation. **Nature**, 515: 406-409.
- Solís-Lemus, C., Knowles, L. L., Ané, C. 2015. Bayesian species delimitation combining multiple genes and traits in a unified framework. **Evolution**, 69: 492-507.
- Spix, J. B. von 1825. Animalia nova sive species nova lacertarum quas in itinere per Brasiliam annis MDCCCXVII-MDCCCXX jussu et auspiciis Maximiliani Josephi I Bavariae Regis suscepto collegit et descripsit Dr. J. B. de Spix. Lipsiae: T. O. Weigel; F. S. Hübschmanni, **Monachii**, 26 pp.
- Stephens, M., Smith, N. J., Donnelly, P. 2001. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. **The American Journal of Human Genetics**, 68: 978-989.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, 123: 585-595.
- Talavera, G., Dincă, V., Vila, R. 2013. Factors affecting species delimitations with the GMYC model: insights from a butterfly survey. **Methods in Ecology and Evolution**, 4: 1101-1110.

- Templeton, A. R., K. A. Crandall, C. F. Sing. 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. **Genetics**, 132: 619-633.
- Townsend, T. M., Alegre, R. E., Kelley, S. T., Wiens, J. J., Reeder, T. W. 2008. Rapid development of multiple nuclear loci for phylogenetic analysis using genomic resources: an example from Squamate reptiles. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 47: 129-142.
- Vaidya, G., D. J. Lohman, R. Meier. 2010. SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multigene datasets with character set and codon information. **Cladistics**, 27: 171-180.
- Vanzolini, P. E., Ramos, A. M. M. 1977. A new species of *Colobodactylus*, with notes on the distribution of a group of stranded microteiid lizards (Sauria, Teiidae). **Papéis Avulsos de Zoologia**, São Paulo, 31: 19-47.
- Vanzolini, P. E., Williams, E. E. 1970. South American anoles: the geographic differentiation and evolution of the *Anolis chrysolepis* species group (Sauria, Iguanidae). **Arquivos de Zoologia**, São Paulo, 19: 1-176.
- Wagler, J. G. 1830. **Natürliches System der Amphibien: mit vorangehender Classification der Säugethiere und Vögel: ein Beitrag zur vergleichenden Zoologie**. JG Cotta, 354p.
- Werneck, F. P. 2011. The diversification of eastern South American open vegetation biomes: historical biogeography and perspectives. **Quaternary Science Reviews**, 30: 1630-1648.
- Werneck, F. P., Gamble, T., Colli, G. R., Rodrigues, M. T., Sites Jr, J. W. 2012. Deep Diversification And Long-Term Persistence In The South American 'Dry Diagonal': Integrating Continent-Wide Phylogeography and Distribution Modeling of Geckos. **Evolution**, 66: 3014-3034.
- Werneck, F. P., Leite, R. N., Geurgas, S. R., Rodrigues, M. T. 2015. Biogeographic history and cryptic diversity of saxicolous Tropiduridae lizards endemic to the semiarid Caatinga. **BMC Evolutionary Biology**, 15: 94.
- Werner, F. 1910. Über neue oder seltene Reptilien des Naturhistorischen Museums in Hamburg. ii. **Eidechsen. Jahrb. Hamburg. Wiss. Anst.**, 27: 1-46.
- Wiens, J. J. 2007. Species delimitation: new approaches for discovering diversity. **Systematic Biology**, 56: 875-878.
- Wiens, J. J., Brandley, M. C., Reeder, T. W. 2006. Why does a trait evolve multiple times within a clade? Repeated evolution of snake-like body form in squamate reptiles. **Evolution**, 60: 123-141.
- Wiens, J. J., Kuczyński, C. A. Smith, S. A. Mulcahy, D. Sites, Jr., J. W. Townsend, T. M. Reeder. T. W. 2008. Branch length, support, and congruence: testing the phylogenomic approach with 20 nuclear loci in snakes. **Systematic Biology**, 57: 420-431.
- Wiley, E. O. 1988. Vicariance biogeography. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 513-542.
- Yang, Z., Rannala, B. 2010. Bayesian species delimitation using multilocus sequence data. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 107: 9264-9269.
- Yang, Z., Rannala, B. 2014. Unguided species delimitation using DNA sequence data from multiple loci. **Molecular Biology and Evolution**, msu279.
- Yonenaga-Yassuda, Y., Vanzolini, P. E., Rodrigues, M. T., Carvalho, C. M. 1995. Chromosome banding patterns in the unisexual microteiid *Gymnophthalmus underwoodi* and in two related sibling species (Gymnophthalmidae, Sauria). **Cytogenetic and Genome Research**, 70: 29-34.
- Zamudio, K. R., Bell, R. C., Mason, N. A. 2016. Phenotypes in phylogeography: Species' traits, environmental variation, and vertebrate diversification. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 113: 8041-8048.